

Université de Montréal

Nouvelles thérapies immunosuppressives dans la prévention et le
traitement du rejet aigu d'allogreffes vascularisées chez le rat

par

Minh Diem Vu, M.Sc.

Département des sciences biomédicales

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en sciences biomédicales

janvier, 2003

©Minh Diem Vu, 2003



w
4
U58
2003
v.107

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Nouvelles thérapies immunosuppressives dans la prévention et le
traitement du rejet aigu d'allogreffes vascularisées chez le rat

présentée par
Minh Diem Vu, M.Sc.

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Gilles St-Louis, M.D.
Président-rapporteur / Représentant du doyen de la FES

Dr Huifang Chen, M.D., Ph.D.
Directeur de recherche

Dr Jiangping Wu, M.D., Ph.D.
Codirecteur

Dre Marie-Josée Hébert, M.D., Ph.D.
Membre du jury

Dr Robert Zhong, M.D.
Examineur externe

RÉSUMÉ

Mot clés: Transplantation d'allogreffe, rejet aigu, thérapie combinée, sirolimus, mycophénolate mofétil, tacrolimus, malononitrilamide FK778, cyclosporine, WAY-160279, rPSGL-Ig.

La transplantation d'organes est un traitement médical indispensable chez les patients défaillants. Cependant, sa cause première d'insuccès demeure le rejet aigu, et une immunosuppression doit être induite chez le patient transplanté afin que l'allogreffe ne soit rejetée. Ironiquement, les traitements immunosuppresseurs actuels causent des toxicités importantes à long terme, et ceci représente le second facteur d'échec en transplantation. La recherche de meilleurs agents et protocoles d'immunosuppression est donc primordiale. Le test de prolifération et la transplantation d'allogreffes chez le rat sont d'excellents modèles expérimentaux pour évaluer l'effet des nouveaux agents immunosuppresseurs, tandis que le principe de l'effet médian est une méthode adéquate pour analyser le type d'interaction entre des agents mis en combinaison. L'objectif du présent projet de recherche consiste à évaluer l'efficacité de quatre nouvelles stratégies immunosuppressives à prévenir contre le rejet aigu d'allogreffe.

Cette thèse de doctorat comporte une partie d'introduction, cinq manuscrits originaux (dont deux articles traitant d'une même étude) répartis en quatre chapitres, et une section de discussion et conclusion où des points précis (méthodologie, résultats, perspectives) de chaque article sont discutés et commentés.

La première étude consiste à tester l'effet de la combinaison du sirolimus, un inhibiteur du signal des facteurs de croissance du lymphocyte T, et du mycophénolate mofétil, un inhibiteur de la synthèse des purines chez les lymphocytes. Les résultats démontrent que cette combinaison produit des effets synergiques dans la prolongation de la survie des allogreffes cardiaques, pancréatiques et rénales chez le rat. Ce

traitement représente une stratégie immunosuppressive prometteuse puisqu'il est exempt d'inhibiteurs de la calcineurine, des immunosuppresseurs causant d'importantes toxicités à long terme.

Le second manuscrit rapporte l'effet de l'association du malononitrilamide FK778, un nouvel inhibiteur de la synthèse des pyrimidines des lymphocytes, et du tacrolimus, un inhibiteur de la calcineurine. Les résultats *in vitro* démontrent que cette combinaison produit des effets synergiques antiproliférateurs chez les lymphocytes B, mais antagonistes chez les lymphocytes T de souris, de primate non-humain et d'humain. Les résultats *in vivo* rapportent que cette combinaison permet de prolonger la survie des allogreffes rénales de rat de manière synergique, et que le degré de synergie est dépendant du patron temporel d'administration des agents.

La troisième étude évalue la combinaison du WAY-160279, un nouvel antagoniste de la molécule d'adhésion VLA-4, et du sirolimus. Les résultats démontrent que cette association permet de prolonger de façon additive à synergique la survie des allogreffes cardiaques chez le rat, et de renverser le rejet aigu installé.

Les résultats de la quatrième étude, évaluant l'association du rPSGL-Ig, un nouvel inhibiteur de la molécule d'adhésion P-sélectine, et d'un agent immunosuppresseur conventionnel, suggèrent que le rPSGL-Ig permet de prolonger significativement la survie des allogreffes rénales chez le rat lorsque combiné avec la cyclosporine, mais pas avec le sirolimus, le tacrolimus ou le mycophénolate mofétil.

Somme toute, nous avons exploré les effets *in vitro* et *in vivo* de quatre traitements combinés d'immunosuppresseurs, dont trois nouvelles molécules (FK778, WAY-160279 et rPSGL-Ig), à prévenir contre le rejet aigu. Les résultats observés chez le rongeur sont encourageants et acquiescent une évaluation préclinique chez le primate non-humain.

SUMMARY

Key words: Organ transplantation, acute rejection, combination therapy, sirolimus, mycophenolate mofetil, tacrolimus, malononitrilamide FK778, cyclosporine, WAY-160279, rPSGL-Ig.

Organ transplantation is an ultimate treatment for patients with end-stage diseases of a vital organ. Acute rejection is the main cause of transplantation failure, thus recipient patients must be immunosuppressed in order not to reject their allograft. Ironically, current immunosuppressive protocols can trigger important toxicities on a long-term basis, which represent the second cause of transplantation failure. Research of better drugs and immunosuppressive treatments is indeed necessary. Proliferation assay and organ transplantation in rats are helpful experimental models for the evaluation of new immunosuppressive drugs, and the median effect principle is a good analytical method to determine the type of interaction between two drugs in a combination therapy. The aim of this research project is to evaluate the efficacy of four new immunosuppressive strategies in prevention of acute allograft rejection.

This doctorate thesis includes an introductory part, five original manuscripts (from which, two papers report the same study) divided into four chapters, and a discussion and conclusion section, where particular aspects (methodology, results, perspectives) of each manuscript are discussed and analyzed.

The first study evaluates the effect of the combination therapy of sirolimus, an inhibitor of T cell growth factors signal, with mycophenolate mofetil, an agent that blocks purine biosynthesis in lymphocytes. Data show that this drug association produces synergistic effects in prolongation of allograft survival in a model of cardiac, pancreatic, and renal transplantation in the rat. This immunosuppressive protocol is

promising since no calcineurin inhibitors are needed. Thus, their long-term toxicities are avoided.

The second manuscript reports the effect of the combined therapy of the malononitrilamide FK778, a new inhibitor of pyrimidine biosynthesis in lymphocytes, with tacrolimus, a calcineurin inhibitor that blocks T cell growth factor production. *In vitro* results show that this drug association produces synergistic effects in B cells proliferation, but antagonistic effects in T cells, in mice, nonhuman primates and humans. *In vivo* data report that the combination of FK778 and tacrolimus extends renal allograft survival in the rat, in a synergistic manner. Moreover, the level of synergism seems to be schedule-dependant of drugs administration.

The third study evaluates the drug association of WAY-160279, a novel antagonist of VLA-4 adhesion molecule, with sirolimus. The results demonstrate that this combined therapy can prolong allograft survival in an additive to synergistic way, and reverse acute rejection in the heart transplantation model in rats.

Data from the fourth study, which investigates the combination therapy of rPSGL-Ig, a new inhibitor of P-selectin adhesion molecule, with a conventional immunosuppressant, suggest that rPSGL-Ig prolongs significantly rat renal allograft survival when combined with cyclosporine but not with sirolimus, tacrolimus or mycophenolate mofetil.

In conclusion, we investigated *in vitro* and *in vivo* effects of four combination therapies of immunosuppressants, including three new molecules (FK778, WAY-160279, and rPSGL-Ig), in prevention of acute rejection of vascularized allografts in the rat. The overall results in rodents are promising and would warrant preclinical evaluation of these drug combinations in nonhuman primates.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
SUMMARY.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTES DES FIGURES.....	xiv
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	xv
DÉDICACE.....	xxiii
REMERCIEMENTS	xxiv

PREMIER CHAPITRE: INTRODUCTION

1.1 Transplantation d'organes	2
1) Importance de transplantation.....	2
2) Historique de la transplantation.....	3
3) Types de transplantation	3
4) Types de rejet d'organe	4
1.2 Immunobiologie du rejet d'allogreffe	9
1) Principes de reconnaissance allogénique	9
2) Reconnaissance allogénique	9
a) Complexe majeur d'histocompatibilité.....	9
b) Présentation allogénique directe	11
c) Présentation allogénique indirecte	13
3) Leucocytes de passage.....	15
4) Rejet aigu d'allogreffe: un bref survol.....	16
1.3 Pathogenèse du rejet d'allogreffe: un ménage à trois explosif!	23
1) Rôles du lymphocyte T dans le rejet aigu d'allogreffe	23

a) Activation du lymphocyte T.....	23
b) Signalisation intracellulaire du lymphocyte T	27
c) Fonctions effectrices du lymphocyte T	30
2) Rôles du lymphocyte B dans le rejet aigu d'allogreffe	33
a) Activation du lymphocyte B.....	33
b) Signalisation intracellulaire du lymphocyte B.	34
c) Fonctions effectrices du lymphocyte B	36
3) Rôles de la cellule endothéliale dans le rejet d'allogreffe	38
a) Recrutement des leucocytes dans l'allogreffe.....	39
b) Cellule endothéliale et lymphocyte T: un duo dynamique.	42
4) Autres facteurs immunitaires.....	43
a) Le rejet aigu est une réponse inflammatoire.....	43
b) Défense de l'endothélium par des facteurs de croissance	43
c) Réaction d'hypersensibilité de type retardé.....	45
5) Facteurs indépendants de l'alloantigène.....	46
a) Ischémie/reperfusion.....	46
b) Statut du donneur.....	47
c) Infection au cytomégalovirus	48
6) Rejet chronique d'allogreffe: un préjudice complémentaire	49
a) Facteurs de risque du rejet chronique.....	50
b) L'inflammation et le rejet chronique.....	51
1.4 Prévention et traitement du rejet d'allogreffe	65
1) Méthodes pour réduire l'immunogénicité de l'allogreffe.....	65
a) Test sanguin ABO	65
b) Test d'histocompatibilité HLA.....	66
c) Détection d'anticorps anti-HLA chez le receveur	68
d) Détection d'anticorps anti-donneur chez le receveur	68
2) Immunosuppression: une brève revue	69

1.5 Thérapie combinée d'agents immunosuppresseurs	73
1) Limites des stratégies classiques et courantes	73
2) Stratégies potentielles	77
1.6 Agents à faible poids moléculaire se liant aux immunophilines	80
1) Cyclosporine	80
a) Propriétés immunosuppressives: mécanisme d'action moléculaire et cellulaire.....	81
b) Évaluations précliniques.....	83
c) Autres propriétés bénéfiques contre le rejet d'organes	84
d) Considérations cliniques	85
e) Effets secondaires et toxicités	87
2) Tacrolimus.....	89
a) Propriétés immunosuppressives: mécanisme d'action moléculaire et cellulaire.....	89
b) Évaluations précliniques.....	92
c) Considérations cliniques	93
d) Effets secondaires et toxicités.....	94
3) Sirolimus.....	95
a) Propriétés immunosuppressives: mécanisme d'action moléculaire et cellulaire.....	96
b) Évaluations précliniques.....	98
c) Considérations cliniques	99
d) Effets secondaires et toxicités.....	101
1.7 Inhibiteurs de la synthèse de nucléotides.....	105
1) Mycophénolate mofétil	105

a) Propriétés immunosuppressives: mécanisme d'action moléculaire et cellulaire.....	105
b) Évaluations précliniques.....	107
c) Considérations cliniques	108
d) Effets secondaires et toxicités.....	110
2) Malononitrilamide FK778.....	111
a) Propriétés immunosuppressives: mécanisme d'action moléculaire et cellulaire.....	112
b) Évaluations précliniques.....	113
c) Effets secondaires et toxicités	115
1.8 Thérapies anti-molécules d'adhésion.....	120
1) WAY-160279	120
a) Propriétés immunosuppressives: mécanisme d'action cellulaire	120
b) Études précliniques	121
c) Effets secondaires et toxicités	123
2) rPSGL-Ig.....	123
a) Propriétés immunosuppressives: mécanisme d'action cellulaire	124
b) Études précliniques	125
c) Effets secondaires et toxicités	127
1.9 Modèles expérimentaux	130
1) Test de prolifération	130
2) Combinaison des lignées congéniques	131
3) Transplantation cardiaque, pancréatique et rénale chez le rat.....	132
1.10 Principe de l'effet médian et index de combinaison	138
1.11 But du projet de recherche.....	145

SECOND CHAPITRE: Manuscrit I

SYNERGISTIC EFFECTS OF MYCOPHENOLATE MOFETIL AND SIROLIMUS IN PREVENTION OF ACUTE HEART, PANCREAS AND KIDNEY ALLOGRAFT REJECTION AND IN REVERSAL OF ONGOING HEART ALLOGRAFT REJECTION IN THE RAT. Vu MD, Qi S, Xu D, Wu J, Peng J, Daloze P, Sehgal S, Leduc B, Chen H. Transplantation 1998, 66 (12): 1575-80..... 149

TROISIÈME CHAPITRE : Manuscrit II et III

THE COMBINATION THERAPY OF MALONONITRILAMIDE FK778 WITH TACROLIMUS ON CELL PROLIFERATION ASSAYS, AND IN RATS RECEIVING RENAL ALLOGRAFTS. Vu MD, Qi S, Wang X, Jiang W, Ma A, Xu D, Bekersky I, Fitzsimmons W, Wu J, Chen H. Transplantation 2003, 75 (9): 1455-9..... 156

EVALUATION OF THE MALONONITRILAMIDE FK778 COMBINED WITH TACROLIMUS ON CELL PROLIFERATION ASSAYS, AND IN A MODEL OF KIDNEY TRANSPLANTATION IN RATS AND NON-HUMAN PRIMATES. Vu MD, Qi S, Wang X, Jiang W, Ma A, Xu D, Daloze P, Bekersky I, Fitzsimmons WE, Chen H. Transplantation Proceedings 2003 (sous presse). 162

QUATRIÈME CHAPITRE : Manuscrit IV

THE COMBINATION THERAPY OF WAY-160279, AN ANTAGONIST OF VERY LATE ANTIGEN-4 (VLA-4), WITH SIROLIMUS IN PREVENTION OF CARDIAC ALLOGRAFT REJECTION IN THE RAT. Vu MD, Qi S, Ouyang J, Jiang W, Ma A, Xu D, Chen H, Kennedy JD. Transplantation 2003 (soumis). 171

CINQUIÈME CHAPITRE : Manuscrit V

P-SELECTIN GLYCOPROTEIN LIGAND-1 (rPSGL-Ig), SHOWS SYNERGY WITH CYCLOSPORINE BUT NOT SIROLIMUS, TACROLIMUS, OR MYCOPHENOLATE MOFETIL IN PREVENTION OF RENAL ALLOGRAFT REJECTION IN THE RAT. Vu MD, Qi S, Ouyang J, Jiang W, Xu D, Shaw GD, Chen H. Transplantation 2003 (soumis). 195

SIXIÈME CHAPITRE : INTERPRÉTATION ET CRITIQUE DES RÉSULTATS

6.1 Manuscrit I	222
1) Critique de la méthodologie.....	222
2) Interprétation des résultats.....	230
6.2 Manuscrits II et III	246
1) Critique de la méthodologie.....	246
2) Interprétation des résultats.....	247
3) Expériences additionnelles	251
6.3 Manuscrit IV.....	271
1) Critique de la méthodologie.....	271
2) Interprétation des résultats.....	271
6.4 Manuscrit V	278
1) Critique de la méthodologie.....	278
2) Interprétation des résultats.....	279

SEPTIÈME CHAPITRE: DISCUSSION ET CONCLUSION

7.1 Discussion.....	283
1) Résultats inattendus	286

2) Traitement immunosuppresseur de demain	305
7.2 Perspectives en transplantation	309
1) Rejet chronique: l'inévitable bête noire.....	309
2) Tolérance: l'ultime solution à la perte d'allogreffe	310
3) Solutions à la pénurie d'organes.....	311
a) Xénotransplantation: quand le porc devient le meilleur ami de l'Homme	311
b) Cryopréservation.....	312
c) Organogenèse	313
d) Importance du don d'organes et de tissus: Portez-vous le ruban vert?	314
7.3 Implication du projet de recherche de doctorat dans l'avancement de la médecine et des sciences	315
HUITIÈME CHAPITRE: SOURCES DOCUMENTAIRES	321
NEUVIÈME CHAPITRE: ANNEXES	415

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.1.1.	Transplantations effectuées au Québec, au Canada et aux États-Unis.....	7
TABLEAU 1.1.2.	Dates importantes en transplantation clinique	8
TABLEAU 1.3.1.	Cytokines et chimiokines impliquées dans le rejet d'allogreffe	64
TABLEAU 1.4.1.	Classification des thérapies immunosuppressives	72
TABLEAU 1.9.1.	Mitogènes polyclonaux utilisés dans les tests de prolifération	133
TABLEAU 1.10.1.	Comparaison de la validité des différentes méthodes d'analyse d'une combinaison d'agents thérapeutiques	143
TABLEAU 6.1.1.	Interprétation du degré de synergie et d'antagonisme dans des études de combinaison d'agents selon la méthode d'index de combinaison	237

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.2.1.	Présentation allogénique directe et indirecte	11
FIGURE 1.2.2.	Rôle des cellules présentatrices d'antigènes dans le rejet d'allogreffe	20
FIGURE 1.2.3.	Mécanismes immunitaires du rejet aigu d'allogreffe vascularisée	21
FIGURE 1.2.4.	Événements cellulaires et moléculaires du rejet d'allogreffe.....	21
FIGURE 1.3.1.	Activation du lymphocyte T	60
FIGURE 1.3.2.	Signalisation intracellulaire du lymphocyte T	61
FIGURE 1.3.3.	Signalisation intracellulaire du lymphocyte B	62
FIGURE 1.3.4.	Recrutement des leucocytes dans le greffon	63
FIGURE 1.6.1.	Structure chimique de la cyclosporine, du tacrolimus, et du sirolimus	102
FIGURE 1.6.2.	Mécanisme d'action de la cyclosporine et du tacrolimus.....	103
FIGURE 1.6.3.	Mécanisme d'action du sirolimus	104
FIGURE 1.7.1.	Structure chimique et pharmacocinétique du mycophénolate mofétil	116
FIGURE 1.7.2.	Mécanisme d'action du mycophénolate mofétil.....	117
FIGURE 1.7.3.	Structure chimique du leflunomide et des malononitrilamides	118
FIGURE 1.7.4.	Mécanisme d'action du malononitrilamide FK778	119

FIGURE 1.8.1.	Mécanisme d'action de la molécule WAY-160279.....	128
FIGURE 1.8.2.	Mécanisme d'action de la protéine de fusion rPSGL-Ig	129
FIGURE 1.9.1.	Évaluation de la thérapie combinée du malononitrilamide FK778 et du tacrolimus à l'aide du test de prolifération	134
FIGURE 1.9.2.	Transplantation hétérotopique cardiaque chez le rat	135
FIGURE 1.9.3.	Transplantation hétérotopique pancréatique chez le rat.....	136
FIGURE 1.9.4.	Transplantation orthotopique rénale chez le rat	137
FIGURE 1.10.1	Relation entre l'équation de l'effet médian et d'autres équations biochimiques majeures	144
FIGURE 6.1.1.	Courbe dose-réponse du sirolimus dans la prévention du rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez le rat (BN→ LEW)	238
FIGURE 6.1.2.	Courbe dose-réponse du mycophénolate mofétil dans la prévention du rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez le rat (BN→ LEW).....	238
FIGURE 6.1.3a.	Effet de la combinaison du sirolimus et du mycophénolate mofétil dans la prévention du rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez le rat (BN→ LEW).....	239
FIGURE 6.1.3b.	Effet de la combinaison du sirolimus et du mycophénolate mofétil dans la prévention du rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez le rat (BN→ LEW).....	239
FIGURE 6.1.4.	Courbe dose-réponse du sirolimus dans le traitement du rejet aigu installé d'allogreffe cardiaque chez le rat (BN→ LEW)	240

- FIGURE 6.1.5.** Courbe dose-réponse du mycophénolate mofétil dans le traitement du rejet aigu installé d'allogreffe cardiaque chez le rat (BN→ LEW)..... 240
- FIGURE 6.1.6.** Effet de la combinaison du sirolimus et du mycophénolate mofétil dans le traitement du rejet aigu installé d'allogreffe cardiaque chez le rat (BN→ LEW)..... 241
- FIGURE 6.1.7.** Courbe dose-réponse du sirolimus dans la prévention du rejet aigu d'allogreffe pancréatique chez le rat (BN→ LEW) 242
- FIGURE 6.1.8.** Courbe dose-réponse du mycophénolate mofétil dans la prévention du rejet aigu d'allogreffe pancréatique chez le rat (BN→ LEW)..... 242
- FIGURE 6.1.9.** Effet de la combinaison du sirolimus et du mycophénolate mofétil dans la prévention du rejet aigu d'allogreffe pancréatique chez le rat (BN→ LEW)..... 243
- FIGURE 6.1.10.** Courbe dose-réponse du sirolimus dans la prévention du rejet aigu d'allogreffe rénale chez le rat (BUF→ WFu)..... 244
- FIGURE 6.1.11.** Courbe dose-réponse du mycophénolate mofétil dans la prévention du rejet aigu d'allogreffe rénale chez le rat (BUF→ WFu)..... 244
- FIGURE 6.1.12.** Effet de la combinaison du sirolimus et du mycophénolate mofétil dans la prévention du rejet aigu d'allogreffe rénale chez le rat (BUF→ WFu)..... 245
- FIGURE 6.2.1.** Effets synergiques de la thérapie combinée du FK778 et du tacrolimus dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes B

activés chez A) la souris, B) le primate non-humain, et C)
l'humain..... 255

FIGURE 6.2.2. Effets antagonistes de la thérapie combinée du FK778 et du tacrolimus dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T activés chez A) la souris, B) le primate non-humain, et C) l'humain..... 257

FIGURE 6.2.3. Courbe dose-réponse du tacrolimus dans l'inhibition de la prolifération des A) lymphocytes T et B) lymphocytes B, chez la souris, le primate non-humain et l'humain..... 259

FIGURE 6.2.4. La sensibilité des A) lymphocytes T et B) lymphocytes B au FK778 est spécifique à l'espèce: souris > primate non-humain ≥ humain 260

FIGURE 6.2.5. La thérapie combinée du FK778 et du tacrolimus dans la prévention du rejet d'allogreffe rénale chez le rat: comparaison de différentes combinaisons..... 261

FIGURE 6.2.6. Comparaison des différents protocoles d'administration de la combinaison du FK778 et du tacrolimus: A) conventionnelle, B) FK778-prétraitée, et c) FK778-retardée..... 262

FIGURE 6.2.7. Histopathologie à l'éosine/hématoxyline des allogreffes rénales traitées avec la thérapie combinée FK778-retardée 263

FIGURE 6.2.7D. Histopathologie à l'éosine/hématoxyline de l'allogreffe rénale #18 traitées avec la thérapie combinée FK778-retardée..... 264

FIGURE 6.2.7E. Histopathologie à l'éosine/hématoxyline de l'allogreffe rénale #19 traitées avec la thérapie combinée FK778-retardée 265

FIGURE 6.2.7F. Histopathologie à l'éosine/hématoxyline de l'allogreffe rénale #23 traitées avec la thérapie combinée FK778-retardée	266
FIGURE 6.2.7G. Histopathologie à l'éosine/hématoxyline de l'allogreffe rénale #24 traitées avec la thérapie combinée FK778-retardée.....	267
FIGURE 6.2.7H. Histopathologie à l'éosine/hématoxyline de l'allogreffe rénale #26 traitées avec la thérapie combinée FK778-retardée.....	268
FIGURE 6.2.7I. Histopathologie à l'éosine/hématoxyline de l'allogreffe rénale #28 traitées avec la thérapie combinée FK778-retardée	269
FIGURE 6.2.8. Histologie comparative: allogreffes rénales traitées avec A) la thérapie combinée FK778-retardée versus B) la thérapie combinée conventionnelle.....	270
FIGURE 6.3.1. Courbe dose-réponse de la molécule WAY-160279 dans la prévention du rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez le rat (BN → LEW).....	277
FIGURE 6.3.2. Courbe dose-réponse du sirolimus dans la prévention du rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez le rat (BN → LEW)	277
FIGURE 7.1.1. Mécanismes d'action des agents immunosuppresseurs évalués	318
FIGURE 7.1.2. Phase précoce du rejet aigu.....	319
FIGURE 7.1.3. Phase centrale du rejet aigu	320

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADCC, Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante d'anticorps (*Antibody dependent cell cytotoxicity*)

BN, Brown Norway

BUF, Buffalo

BTK, Tyrosine kinase de Bruton (*Bruton's tyrosine kinase*)

CI, Index de combinaison (*Combination index*)

Con A, Concanavaline A

CsA, Cyclosporine

CYP3A4, Isoenzyme 3A4 du cytochrome P450

DHODH, Dihydroorotate déshydrogénase

DMSO, Diméthyl sulfate

FDA, *Food and Drug Administration*

FITC, Fluorescéine isothiocyanate

FKBP-12, Protéine de liaison au FK506-12 (*FK506 binding protein-12*)

IFN- γ , Interféron- γ

Ig, Immunoglobuline

IL, Interleukine

IL-2R, Récepteur de l'interleukine-2

IMPDH, Inosine monophosphate déshydrogénase

IP₃, Inositol triphosphate

K, *killer*

LEW, Lewis

LPS, Lipopolysaccharides

MHC, Complexe majeur d'histocompatibilité (*Major histocompatibility complex*)

MMF, Mycophénolate mofétil

MNA, Malononitrilamide

mTOR, Cible de la rapamycine (*mammalian target of rapamycin*)

NFAT, Facteur nucléaire du lymphocyte T activé (*Nuclear factor of activated T cell*)

NK, *natural killer*

PDGF, Facteur de croissance des plaquettes (*Platelet-derived growth factor*)

PE, Phycoérythrine

PHA, Phytohémagglutinines

PLC γ 1, Phospholipase C γ 1

PSGL-1, Ligand glycoprotéine 1 de la P-sélectine (*P-selectin glycoprotein ligand-1*)

SIR, Sirolimus

TAC, Tacrolimus

TCR, Récepteur du lymphocyte T (*T cell receptor*)

TNF- α , Facteur nécrosant tumoral- α (*tumoral necrosis factor- α*)

UNOS, *United Network for Organ Sharing*

VCAM-1, *Vascular cell adhesion molecule-1*

VLA-4, *Very late antigen-4*

WFu, Wistar Furth

Thuong yeu tang Me Dung, Bo Ngoc, va Anh Duc.

*Votre amour et support inconditionnel me
sont sources d'inspiration premières.*

REMERCIEMENTS

I would like to express my deep gratitude to Dr. Huifang Chen who always believed in me, and who confided me such promising research projects. You taught me not only the rules to become a successful scientist, but a sagacious and wiser person in life.

Thanks to Dr. Jiangping Wu for accepting to be my co-director of thesis and for all advises.

Warm thanks to Dr. Shijie Qi for the highly appreciated microsurgical work and the devoted friendship. Special thanks to Dr. Dasheng Xu, Dr. Anlun Ma, and Dr. Hongyu Luo for the teaching and judicious advises. Thanks to Dr. Wenlei Jiang, Dr. Jun Ouyang, and Dr. Xiang Wang for the useful technical assistance. Thank you for being good friends and colleagues.

Merci au personnel des animaleries des hôpitaux Notre-Dame et Hôtel-Dieu. Merci à Sylvie Paiement pour la précieuse aide bibliographique. Merci à l'équipe du service d'audiovisuel de l'hôpital Notre-Dame. Merci au duo dynamique du service de cytométrie en flux de l'IRCM. Merci à Bruno Lachance pour les solutions aux pépins informatiques. Merci à Carmen Rodriguez pour les retouches linguistiques, les pauses-café surprises et les conseils amicaux.

Merci au Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche, à la Faculté de Médecine et au CRCHUM pour les bourses et subventions plus qu'appréciées.

Ces années d'études graduées n'auraient guère été aussi agréables sans le soutien des parents et amis. Merci à Geneviève Moreau, à Mélanie Brunelle et à Fanny Thiffault pour l'amitié délicieuse, les oreilles attentives et les paroles de sagesse. Thanks to Denise Huggins for being a genuine friend. Merci à Marc Jolicoeur et à Stéphane Johnson pour « les crèmes brûlées pour l'âme » et les épaules fidèles. Merci à Marc Véronneau pour le support amical. Cám ơn Bác Nhung đã cho tôi biết lòng dũng cảm và lòng quảng đại. Bạn là cơ quan anh hùng nhất của tôi. Thoughtful thanks. Enfin, j'aimerais remercier chaleureusement ma famille pour l'encouragement incessant.

Chi pensa poco, sbaglia assai

- Leonardo Da Vinci

PREMIER CHAPITRE

INTRODUCTION

1.1 TRANSPLANTATION D'ORGANES

Importance de la transplantation

Bien que la transplantation demeure une procédure chirurgicale fascinante et des plus révolutionnaires en médecine, elle évoque une image, voire un concept, ayant vu le jour depuis plusieurs millénaires. Au fil des temps, la transplantation a véhiculé différentes idéologies et valeurs. Tantôt d'ordre médical, tantôt à caractère spirituel voire d'aspect religieux. On n'a qu'à se référer au monde mythologique où régnèrent dieux, héros et chimères avec têtes transplantées ou membres de toutes sortes, majoritairement d'espèces différentes (ce sont des exemples de xénotransplantation). Ces légendes issues de l'imagination humaine reconnaissent la transplantation d'organes comme une thérapie permettant de remplacer un membre malade, par exemple une jambe atteinte de gangrène, de ressusciter un défunt, tel que raconte l'histoire légendaire du Dieu indien Ganesha qui renaquit après s'être fait transplanter une tête d'éléphant, ou tout simplement une thérapie qui permet de revivifier l'énergie spirituelle, tel que relate la belle légende chinoise du médecin Pien Ch'iao qui rectifia l'énergie intérieure de deux patients en mal spirituel en échangeant leurs cœurs. En outre, dans les tous premiers récits bibliques, le prophète Ezekiel fit référence à la transplantation cardiaque. Malgré les différentes pensées qu'elle évoqua, la transplantation d'organes a toujours représenté aux yeux de l'Homme une intervention thérapeutique voire une méthode de guérison.

Depuis l'époque de la Seconde Guerre Mondiale, la transplantation d'organes était perçue uniquement comme une intervention médicale de dernier secours. Aujourd'hui, elle est considérée comme une approche thérapeutique efficace de soin de santé aux personnes ayant une défaillance ou une malformation d'organes vitaux. Par exemple, pour la majorité des patients insuffisants rénaux traités par hémodialyse ainsi que ceux souffrant de maladies cardiovasculaires, de cirrhoses ou d'hépatites chroniques, et même de diabète, la transplantation d'organes représente un moyen de

retrouver une meilleure qualité de vie, voire même un espoir de guérison et de survie. En terme de données statistiques, 432 Québécois ont reçu un organe au cours de l'année 2000 (*Québec-Transplant*) (Tableau 1.1.1). Au Canada, plus de 1 667 transplantations d'organes solides ont été effectuées en 1999 (CAT, *Canadian Association of Transplantation*). Ce nombre est d'autant plus significatif aux États-Unis, comme le rapporte l'UNOS (*UNOS, United Network for Organ Sharing*), dont plus de 24 076 transplantations rénales, hépatiques, pancréatiques, rénale-pancréatiques, intestinales, cardiaques, cardiaque-pulmonaires, et pulmonaires ont été effectuées durant l'année 2001. Lorsqu'on regarde ces chiffres, il est indéniable que la recherche sur la transplantation demeure nécessaire. Des développements dans le domaine de l'immunosuppression sont essentiels afin d'approfondir nos connaissances et nous permettre de découvrir de nouvelles stratégies thérapeutiques ou des agents immunosuppresseurs/immunomodulateurs plus efficaces, plus spécifiques et comportant moins d'effets indésirables, voire dans la mesure du possible permettre l'induction d'une tolérance spécifique envers l'allogreffe.

Historique de la transplantation

Sans mentionner l'historique de la transplantation dans cette section d'introduction, il est intéressant de souligner quelques ouvrages de référence qui en font mention (Annexe 1). Le tableau 1.1.2 résume les dates importantes de l'histoire de la transplantation clinique, telles que citées dans des articles de revue de littérature et/ou des manuels de transplantation et d'immunologie (Kahan, 1991; Brent, 1997; Groth et al., 2000). De plus, Desquesnoy (2002a, 2002b) résume de manière très détaillée les étapes marquantes de l'histoire de l'immunobiologie de la transplantation (Annexe 2).

Types de transplantation

Il existe quatre types de transplantation d'organes: autologue, syngénique, allogénique et xénogénique. La transplantation autologue se produit au sein d'un même

individu, comme dans les cas des patients brûlés où ils reçoivent une greffe de peau provenant d'une autre partie de leur corps. La transplantation syngénique est une intervention beaucoup plus rare en clinique puisqu'elle s'effectue entre jumeaux identiques monozygotes. Cependant, elle est beaucoup plus effectuée au niveau expérimental avec l'utilisation d'animaux de lignées congéniques. La transplantation de type allogénique est de loin celle la plus pratiquée, et elle consiste en une transplantation entre individus de même espèce mais qui sont génétiquement différents. Il est à noter qu'en clinique, il existe deux types de transplantation allogénique dépendamment que le donneur soit vivant ou cadavérique. Les transplantations allogéniques cadavériques sont les plus fréquentes puisque le type d'organe n'est pas limité comme il l'est pour le donneur vivant, où seulement le rein et le foie partiel peuvent être partagés. Le dernier type de transplantation est la transplantation xénogénique et elle se produit entre organismes d'espèces différentes (par exemple, la transplantation d'un rein de porc transgénique à un humain). Seulement exploitée au niveau expérimental, la transplantation xénogénique est théoriquement faisable en clinique mais éthiquement infaisable pour l'instant. Dans cette thèse de doctorat, nous discuterons plutôt de la transplantation allogénique.

Types de rejet d'organe

Puisque la transplantation d'organes est un phénomène « non physiologique », lorsqu'on transplante une allogreffe chez un individu, il se produit une réaction immunitaire dirigée contre le greffon, le rejet d'organe. Il existe quatre types de rejet de greffe qui sont caractérisés par des mécanismes induits par différents types de cellules effectrices (par exemple, les lymphocytes T alloréactifs auxiliaires CD4⁺ et cytotoxiques CD8⁺, les lymphocytes B et les anticorps spécifiques contre l'alloantigène, etc.). Cependant, la classification de ces types de rejet s'effectue selon l'histopathologie et le temps que survienne le rejet après une transplantation. 1) Rejet hyperaigu: Le rejet hyperaigu survient la plupart du temps sur la table d'opération, c'est à dire durant les premières minutes/heures suivant l'anastomose des vaisseaux sanguins du receveur

avec ceux du greffon. Il est caractérisé par une occlusion thrombotique (dépôt de fibrine, plaquettes, et infiltrats de granulocytes et monocytes) de la vasculature de l'allogreffe et une nécrose de la paroi vasculaire, causées par un travail d'équipe incluant les cellules endothéliales, le complément, et les cellules K cytolytiques. Les dommages ischémiques en sont irréversibles, provoquant ainsi la perte immédiate du greffon (Williams et al., 1968; Krensky, 2001). Le rejet hyperaigu est initié par la présence d'anticorps préformés spécifiques contre le donneur, chez le receveur. Les anticorps préformés anti-donneur peuvent être de plusieurs origines (Kissmeyer-Nielsen et al., 1966). Autrefois, la compatibilité des groupes sanguins ABO entre le donneur et le receveur n'était pas vérifiée, et le rejet hyperaigu était principalement causé par les anticorps IgM préformés dits « naturels » chez le receveur, ((Kissmeyer-Nielsen et al., 1966; Abbas et al., 2000). Entre autre, le rejet hyperaigu induit par ces anticorps naturels est l'une des principales barrières à la réussite en xénotransplantation (Rosenberg et al., 1969). Aujourd'hui, avec le développement des tests d'histocompatibilité HLA et des tests sanguins, le rejet hyperaigu est plutôt causé par des anticorps IgG préformés dirigés contre des alloantigènes présents chez le receveur suite à une exposition ultérieure par l'entremise de transfusions sanguines, de transplantations d'organes ou de grossesses fréquentes (Stastny, 1965; Abbas et al., 2000).

2) Rejet accéléré: Le rejet accéléré survient après quelques jours suite à une transplantation, et tout comme le rejet hyperaigu, il est caractérisé par une thrombose vasculaire chez l'allogreffe, qui est causée par la faible présence d'anticorps alloréactifs préformés (Simpson et al., 1970).

3) Rejet aigu: Le rejet aigu se manifeste généralement après la première semaine de transplantation (de sept à 10 jours posttransplantation dans le modèle animal), mais il peut survenir après plusieurs semaines chez un patient traité avec une dose insuffisante d'immunosuppresseurs. Le rejet aigu est caractérisé par un dommage vasculaire et parenchymateux qui est le résultat d'une attaque cellulaire et humorale dont les lymphocytes T, les macrophages, les lymphocytes B et les anticorps en sont les principaux responsables (Lindquist et al., 1968a, 1968b; Gardner et al., 1968; Guttman et al., 1967). Le rejet aigu est le type de rejet qu'on rencontre le plus

fréquemment en clinique, et il fait l'objet de cette thèse de doctorat. Nous y reviendrons de manière plus approfondie à la section 1.2. 4) Rejet chronique: Le rejet chronique, aussi appelé athérosclérose accélérée ou athérosclérose d'allogreffe, survient à partir de six à douze mois après une transplantation d'organe vascularisé (Meade et al., 1966). Le rejet chronique est caractérisé par une fibrose, causée par le processus de réparation tissulaire en réponse à la nécrose des cellules parenchymateuses suite au rejet aigu; une occlusion artérielle, causée par la prolifération des cellules musculaires lisses de l'intima, la prolifération des fibroblastes et la synthèse de collagène en réponse aux facteurs de croissance (par exemple, le PDGF [*platelet-derived growth factor*]) sécrétés par des macrophages activés par des cytokines (par exemple, l'IL-1, le TNF- α , l'IFN- γ) produites par des lymphocytes alloréactifs; et une perte des structures normales de l'organe (Harlan et al., 1967; Jolicoeur, 2000; Shi et al., 1996).

TABLEAU 1.1.1. Transplantations effectuées au Québec, au Canada et aux États-Unis.**A) Statistiques pour le Québec (Québec-Transplant, 2002)**

Années	Rein (cad.)	Rein (vivant)	Rein/ pancréas	Pancréas	Foie	Cœur	Cœur/ poumons	Poumons	Total
1995	199	26	2	1	87	51	2	14	382
1996	184	14	1	2	95	37	0	10	341
1997	167	16	1	3	86	44	2	22	341
1998	170	30	3	8	90	36	2	17	356
1999	201	31	7	13	112	39	2	22	427
2000	217	31	3	17	111	44	2	29	454
2001	214	46	6	11	100	39	1	25	442

B) Statistiques pour le Canada (CAT, 2002)

Années	Rein (cad.)	Rein (viv.)	Rein/ pancréas	Pancréas	Foie	Cœur	Cœur/ poumons	Poumons	Total
1995	692	229	Nd	Nd	328	183	8	72	1512
1996	687	265	Nd	Nd	354	166	4	65	1541
1997	708	288	Nd	Nd	352	164	7	59	1578
1998	655	336	Nd	Nd	342	154	7	51	1545
1999	647	378	Nd	Nd	384	167	5	57	1638

C) Statistiques pour les États-Unis, année 2001 (UNOS, 2002)

Rein (cad.)	Rein (viv.)	Rein/ pancréas	Pancréas	Foie	Cœur	Cœur/ poumons	Poumons	Intestin	Total
8203	5949	884	468	5177	2202	27	1054	112	24076

Nd, non-disponible; cad., cadavérique; viv., vivant.

TABLEAU 1.1.2. Dates importantes en transplantation clinique

1905 -	Technique d'anastomose vasculaire, Dr Alexis Carrel et Dr Charley Claude Guthrie.
1906 -	Grefe cornéenne, Dr Edward Zim, Australie.
1908 -	Grefe de peau allogénique: Dr Jacques Louis Reverdin, Suisse.
1918 -	Transfusion sanguine
1954 -	Transplantation rénale entre jumeaux identiques, Dr Joseph Murray et Dr David Hume, Boston.
1958 -	Première transplantation rénale au Canada avec donneur vivant, Montréal.
1962 -	Transplantation rénale cadavérique, Dr Joseph Murray et Dr David Hume, Boston.
1963 -	Transplantation hépatique, Dr Thomas Starzl, Pittsburg.
1963 -	Transplantation pulmonaire, Dr James Hardy, Université de Mississipi.
1963 -	Première transplantation rénale cadavérique au Canada, Montréal.
1967 -	Transplantation cardiaque, Dr Christiaan Barnard, Afrique du Sud.
1967 -	Transplantation pancréatique, Dr Richard C. Lillehei, Minnesota
1968 -	Première transplantation cardiaque au Canada, Montréal.
1970 -	Première transplantation hépatique au Canada, Dr Pierre Daloze, Montréal.
1979 -	Transplantation pancréatique avec donneur vivant, Minneapolis.
1981 -	Transplantation cardiaque-pulmonaire, Dr Norman Shumway, Stanford.
1982 -	Barney Clark reçoit le premier cœur artificiel, Utah.
1984 -	Transplantation cardiaque-hépatique, Dr Thomas Starzl, Pittsburgh.
1984 -	Baby Fae reçoit un cœur de babouin, Loma Linda.
1989 -	Transplantation hépatique avec donneur vivant.
1990 -	Transplantation cardiaque-pulmonaire.
1991 -	Transplantation de l'intestin grêle.
1996 -	Transplantation hépatique de type « <i>split-liver</i> ».

1.2 IMMUNOBIOLOGIE DU REJET D'ALLOGREFFE

Reconnaissance allogénique

Complexe majeur d'histocompatibilité. Le système immunitaire d'un individu a pour rôle physiologique de défendre l'organisme contre l'invasion de tout corps étranger incluant les virus, les bactéries et les greffons de donneurs génétiquement différents. Pour ce faire, le système immunitaire se doit d'être doté d'une capacité à reconnaître et à distinguer le soi (receveur) du non soi (donneur, c'est-à-dire l'allogreffe). Dans le cadre de la transplantation d'organes, cette capacité de distinction du système immunitaire se réfère à la notion de reconnaissance allogénique. Tel que décrit dans des manuels d'immunologie et des revues de littérature (Abbas et al., 2000; Le Moine et al., 2002; Gould et al., 1999; Rogers et al., 2001), la capacité d'un individu à reconnaître et distinguer des cellules et des organes transplantés comme étant soi ou non-soi est déterminée par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC, *major histocompatibility complex*). La notion de MHC a été introduite par Gorer (1937) suite à une étude de greffe de peau entre donneurs et receveurs incompatibles chez la souris. En collaboration avec Snell, les deux chercheurs identifièrent par la suite le locus H-2 chez la souris (MHC murin). En 1967, Doherty et Zinkernagel (Bach et al., 1967) découvrirent le locus Hu-1 ou HLA (*human leukocyte antigen*) chez l'humain (MHC humain). En effet, ce sont les molécules MHC qui sont reconnues et ciblées par les cellules immunitaires, et elles représentent l'élément déclencheur des réactions vigoureuses et instantanées du rejet d'allogreffe. Les molécules MHC sont codées par des gènes hautement polymorphiques (c'est-à-dire, des gènes codant pour des alloantigènes qui diffèrent entre individus d'une même espèce) retrouvés dans le locus MHC, et qui sont hérités des deux parents et exprimés de façon codominante (c'est-à-dire, que la descendance directe exprime un allèle de chaque parent. Par exemple, la descendance (A X B)_{F1} possède l'allèle A et l'allèle B) (Abbas et al., 2000). Ainsi, une allogreffe exprime des alloantigènes (codés par les gènes polymorphiques MHC du donneur) qui sont perçus comme étrangers (non soi) par les cellules immunitaires du

receveur. En outre, des études rapportent l'importance des molécules MHC dans le rejet d'allogreffes vascularisées chez le porc. Pescovitz et al. (1984) ont démontré que certaines allogreffes rénales compatibles au niveau des molécules MHC de classe II pouvaient survivre indéfiniment, sans que les receveurs n'aient recouru à une immunosuppression, comparativement aux allogreffes rénales incompatibles qui étaient rejetées en dedans d'une période de deux semaines. Le rôle physiologique des molécules MHC est de présenter des déterminants peptidiques étrangers aux lymphocytes T du receveur, les principales cellules immunitaires impliquées dans le rejet aigu d'allogreffe. Ces déterminants peptidiques peuvent représenter 1) une molécule MHC soit liée à un peptide non soi (situation normale), 2) une molécule MHC soit liée à un peptide dérivé d'une molécule MHC non soi (reconnaissance allogénique indirecte) ou 3) une molécule MHC non soi liée à un peptide non soi (reconnaissance allogénique directe).

En plus des molécules MHC, il existe aussi des molécules du complexe mineur d'histocompatibilité qui peuvent également jouer un rôle dans la reconnaissance allogénique. Ces molécules du complexe mineur d'histocompatibilité (souvent appelées non MHC) retiennent de plus en plus l'attention des cliniciens et chercheurs en transplantation. En effet, il a été démontré dans un modèle de greffe de peau chez la souris que l'incompatibilité au niveau d'un seul complexe mineur d'histocompatibilité peut résulter en un rejet de greffe après 60 à 100 jours posttransplantation, comparativement à six à huit jours lors d'incompatibilité au niveau des molécules MHC (Carpenter, 2001). Cependant, même si le donneur et le receveur sont compatibles au niveau du locus MHC, l'addition de plusieurs complexes mineurs d'histocompatibilité disparates peuvent provoquer des réponses immunes très vigoureuses impliquant principalement des lymphocytes T alloréactifs (Valujskikh et al., 1999). De plus, il a été rapporté qu'autant les gènes et protéines issues des gènes du MHC (H-2) que ceux du complexe mineur d'histocompatibilité (non H-2) jouent un rôle important dans le rejet d'allogreffe cardiaque chez la souris (Peugh et al., 1986).

Présentation allogénique directe. Dans l'immunologie de la transplantation allogénique, il existe deux types de présentation des alloantigènes: la présentation directe et la présentation indirecte (Gould et al., 1999; Abbas et al., 2000; Figure 1.2.1). Les mécanismes de reconnaissance allogénique directe et indirecte ne sont pas mutuellement exclusifs, et peuvent être impliqués dans le rejet d'allogreffe de façon simultanée ou à des temps différents (Rogers et al., 2001). Dans le contexte non naturel de la transplantation, les alloantigènes sont présentés aux cellules immunitaires du receveur par une voie autre que celle empruntée par les virus et bactéries, c'est-à-dire la présentation allogénique directe. Cette présentation directe dite « non physiologique » est un phénomène typique à la transplantation d'organes, et elle implique qu'un lymphocyte T du receveur puisse directement reconnaître une molécule MHC non soi intacte (c'est-à-dire sans qu'elle ne soit fragmentée en déterminants peptidiques) et qu'elle soit présentée par une cellule présentatrice d'antigène du donneur dans le greffon. Le principe moléculaire expliquant ce phénomène distinct consiste à ce que la reconnaissance directe de la molécule MHC non soi par un lymphocyte T soit due par la grande similarité structurale entre cette molécule MHC non soi et une molécule MHC du receveur (soi) exprimant des peptides antigéniques (Abbas et al., 2000; Gould et al., 1999). Il y a alors un phénomène de réaction croisée entre un lymphocyte T sélectionné à reconnaître un déterminant particulier, représenté par une molécule MHC soi liée à un peptide étranger, et un déterminant représenté par une molécule MHC non soi. C'est l'hypothèse de la réaction croisée. Plusieurs études corroborent la présentation allogénique directe comme étant un phénomène de réaction croisée entre le récepteur du lymphocyte T (TCR, *T cell receptor*) avec une molécule MHC allogénique (non soi). Ces études utilisant des clones de lymphocytes T rapportent que des lymphocytes T spécifiques contre des antigènes peptidiques présentés par des molécules MHC soi sont capables de reconnaître directement des molécules MHC non soi (Ben-Nun et al., 1983; Zinkernagel et al., 1978; Hunig et al., 1981). En effet, Ben-Hu et al. (1983) ont démontré que des clones de lymphocytes T spécifiques contre I-Es/d associé à la protéine myéline

basique et contre I-Ak associé au virus influenza peuvent effectuer une réaction croisée avec des cellules exprimant DBA/2, des molécules du complexe mineur d'histocompatibilité non soi. Plus récemment, en utilisant une approche combinatoire d'une banque de peptides, Daniel et al. (1998) ont démontré que le TCR d'un lymphocyte T alloréactif dirigé contre Hb(64-76)/I-Ek peut reconnaître et se lier spécifiquement à un épitope allogénique mimant Hb(64-76)/I-Ek. Cependant, la plus grande évidence qui supporte l'hypothèse de la réaction croisée demeure l'observation que la majorité de la reconnaissance directe implique des lymphocytes T mémoires, indiquant que ces lymphocytes T ont déjà été activés ultérieurement (Lombardi et al., 1990; Merckenschlager et al., 1991). Des récentes études rapportent l'importance de la présentation directe par la réaction croisée dans le rejet d'allogreffe (Pantenburg et al., 2002). Les auteurs démontrent que des lymphocytes T CD4⁺ initialement activés par une infection au *Leishmania major* peuvent effectuer une réaction croisée avec les alloantigènes du greffon et altérer la réponse allogénique contre le greffon. Ainsi, dans un contexte de transplantation, une molécule MHC allogénique (non soi) liée à un peptide antigénique peut mimer le déterminant formé par une molécule MHC soi et un peptide étranger particulier, et être directement reconnue par un lymphocyte T alloréactif. La présentation allogénique directe fut très populaire durant les années 80 pour expliquer le mécanisme de reconnaissance allogénique dans le rejet aigu d'allogreffe et la réponse allogénique. Cependant, la première étude qui prouve sans équivoque la présentation allogénique directe joue un rôle dans le rejet d'allogreffe n'a été effectué que très récemment. Dans cette élégante étude, Pietra et al. (2000) ont démontré qu'une repopulation de lymphocytes T CD4⁺ syngéniques chez des souris SCID (souris déficientes en lymphocytes T et B) leur donne la capacité de rejeter des allogreffes cardiaques qui expriment des molécules MCH de classe II, mais pas des allogreffes qui en sont déficientes. Puisque les souris SCID sont déficientes en lymphocytes T CD8⁺ et qu'elles n'ont pas la capacité d'emprunter la voie de reconnaissance allogénique indirecte limitée aux molécules MCH de classe II, les résultats suggèrent que la présentation allogénique directe empruntée par les

lymphocytes T CD4⁺ est nécessaire et suffisante pour initier le rejet d'allogreffe. Cependant, des études effectuées chez des patients transplantés rénaux démontrent que les taux de lymphocytes T mémoires CD4⁺/CD45RO⁺ spécifiques contre le donneur sont significativement diminués après quatre mois posttransplantation, sans que les taux de lymphocytes T naïfs CD4⁺/CD45RA⁺ spécifiques contre le donneur ne soient altérés (Baker et al., 2001). Ces résultats suggèrent que l'importance de la présentation allogénique directe par les lymphocytes T CD4⁺ dans le rejet d'allogreffe diminue avec le temps après la transplantation. En effet, pour devenir des lymphocytes T alloréactifs spécifiques contre le donneur, l'activation des lymphocytes T naïfs doivent être amorcée dans les organes lymphoïdes et en présence de cellules dendritiques du donneur. Or, ces cellules dendritiques meurent habituellement après les premières semaines posttransplantation (Rogers et al., 2001). Il semble alors que la reconnaissance allogénique directe joue un rôle plus important dans l'initiation et les étapes précoces du rejet d'allogreffe.

Présentation allogénique indirecte. Depuis la dernière décennie, beaucoup d'études rapportent l'importance de la présentation allogénique indirecte dans le rejet d'allogreffe (Auchincloss et al., 1993; Frasca et al., 1998; Rogers et al., 2001; Benichou, 1999). La voie de présentation indirecte, dite « physiologique » est un processus de reconnaissance antigénique conventionnel tel qu'observé dans l'immunité contre les virus et les microbes. La présentation allogénique indirecte implique qu'une molécule MHC du donneur (non soi) soit procédée (c'est-à-dire, fragmentée en déterminants peptidiques), et que ces peptides dérivés associés à une molécule MHC du receveur (soi) soient présentés par une cellule présentatrice d'antigènes du receveur (soi) (Abbas et al., 2000). La première étude à rapporter qu'il existe une voie indirecte dans la reconnaissance allogénique remonte en 1982 (Lechler et al., 1982). Dans cette étude, les auteurs démontrent que les allogreffes rénales (ASXAUG)F1 transplantées chez des receveurs AS n'étaient pas rejetées, mais que les receveurs AS rejetaient de manière tardive les allogreffes totalement allogéniques AUG. Compte tenu que les tissus

parenchymateux du rein sont antigéniques mais non immunogéniques, ils sont incapables d'activer les lymphocytes T spécifiques contre le donneur via la voie de la reconnaissance allogénique directe, mais plutôt par une autre voie de reconnaissance allogénique (Lechler et al., 1982). Généralement, ce sont les lymphocytes T auxiliaires (CD4⁺) qui participent à la présentation indirecte car l'alloantigène est capturé par une cellule présentatrice d'antigène du receveur, et cette dernière emprunte la voie phagocytaire via les vésicules endosomales pour exposer l'alloantigène digéré à sa surface cellulaire à l'aide des molécules MCH de classe II. La première étude à prouver l'importance de la présentation allogénique indirecte dans le rejet d'allogreffe démontre que des souris *knock-out* au niveau du gène MHC de classe I sont capables de rejeter des greffes de peau provenant de souris *knock-out* au niveau du gène MHC de classe II (Auchincloss et al., 1993). De plus, Benichou (1999) rapporte qu'en absence de la voie de reconnaissance allogénique directe, la voie indirecte est suffisante pour induire le rejet d'allogreffe dans un modèle de greffe de peau chez la souris. Récemment, Ensminger et al. (2002) ont démontré que la reconnaissance allogénique indirecte des molécules MHC de classe I par les lymphocytes T CD4⁺ semble jouer un rôle important dans le développement d'athérosclérose d'allogreffe dans un modèle de transplantation aortique chez la souris. Il semble que les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques et la production d'anticorps sont dépendants des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires. En outre, des études effectuées dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat démontrent l'importance de la présentation allogénique indirecte par les lymphocytes T CD4⁺, et non les lymphocytes T CD8⁺, dans le développement du rejet chronique (Pettigrew et al., 1998; Szeto et al., 2002). Il est cependant possible que certains antigènes issus de cellules allogéniques phagocytées soient présentés par des molécules MHC de classe I et reconnus de manière indirecte par des lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ (Krensky, 2001). Ce phénomène de « *cross-priming* » pourrait contribuer au rejet tardif du greffon chez des patients transplantés. Nevala et al. (1998) ont démontré que la présentation allogénique indirecte d'antigènes du complexe mineur d'histocompatibilité permet

l'activation et la production de lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ alloréactifs spécifiques contre le donneur.

Leucocytes de passage

Dans la transplantation d'organes vascularisés, les cellules effectrices du receveur doivent traverser l'endothélium vasculaire afin de pouvoir se rendre au tissu parenchymateux du greffon. Pour se faire, ces cellules immunitaires doivent reconnaître l'endothélium vasculaire comme étant non soi, et comme les cellules endothéliales d'un endothélium intact voire non endommagé n'expriment pas de molécules MHC de classe II, elles ne constituent pas l'élément déclencheur du rejet d'allogreffe. Ce sont plutôt les leucocytes de passage qui sont responsables d'initier cette réponse immune. Les leucocytes de passage sont des cellules présentatrices d'antigènes du donneur qui ont été transférées de façon passive dans le greffon (par exemple, les cellules dendritiques) (Bastien et al., 1970). Ces derniers peuvent ensuite sortir du greffon en empruntant le système lymphatique du receveur et se retrouver dans les ganglions lymphatiques. Ainsi, les cellules du donneur (reconnaissance allogénique directe) ou leurs antigènes peptidiques (reconnaissance allogénique indirecte) sont reconnus par les cellules immunitaires de l'hôte. Les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ circulants reconnaissent ainsi l'antigène étranger au site du ganglion lymphatique, deviennent activés, prolifèrent, se différencient et sécrètent des cytokines responsables d'engendrer la réponse immune (Krensky et al., 2001). Néanmoins, il a été suggéré que les cellules présentatrices d'antigènes du donneur ne soient pas absolument requises pour stimuler le rejet d'organes vascularisés puisqu'il est rare d'en retrouver en grande quantité dans certains types d'organes. Rolstad (1977) rapporte d'ailleurs que les leucocytes de passages ne sont pas nécessaires dans la réponse allogénique dans un modèle de greffe de peau. Cependant, van Schilfgaarde et al. (1980) ont démontré que les leucocytes de passage jouent un rôle important dans le rejet d'allogreffe cardiaque. Il semble alors que l'implication des leucocytes de passage dans le rejet d'allogreffe est dépendante du type d'organe, à savoir qu'il soit vascularisé ou non. Les cellules dendritiques sont reconnues

à être le type de cellules présentatrices d'antigènes qui jouent le rôle le plus important dans la réponse immune contre le greffon (Larsen et al., 1990). Elles peuvent être originaires du donneur et présentes dans l'interstitium du greffon ou originaires du receveur et migrant dans le greffon via la vasculature de l'organe. En effet, les cellules présentatrices d'antigènes du receveur peuvent entrer dans le greffon, récolter des antigènes allogéniques du donneur et les transporter vers les ganglions lymphatiques, ou alors ces alloantigènes peuvent migrer dans les organes lymphoïdes, être réarrangés et exprimés par des cellules présentatrices d'antigènes du receveur (Figure 1.2.2).

Rejet aigu d'allogreffe: un bref survol

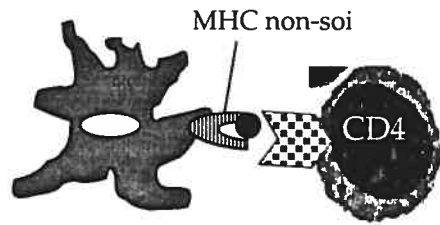
Le rejet aigu est un processus immunitaire, de type adapté, tel qu'observé dans les maladies autoimmunes et les réactions allergiques. Il est caractérisé par une infiltration cellulaire (majoritairement des lymphocytes T et des macrophages) et humorale (des anticorps spécifiques et le complément) dans l'allogreffe, causant un dommage vasculaire et parenchymateux au greffon, une semaine après la transplantation (Lindquist et al., 1968a, 1968b; Gardner et al., 1968; Guttman et al., 1967). Les processus de différenciation des lymphocytes T effecteurs et de production d'anticorps spécifiques en réponse à l'allogreffe, c'est-à-dire suite à la reconnaissance des molécules MHC non soi du greffon par les cellules immunitaires du receveur, justifient le temps de délai de l'initiation du rejet aigu (cela s'applique surtout pour la réponse humorale). Les lymphocytes T jouent un rôle primordial dans le rejet aigu en réagissant contre les alloantigènes présents sur les cellules endothéliales qui tapissent les vaisseaux sanguins de l'allogreffe et les cellules parenchymateuses qui composent l'organe (Figure 1.2.3). Les lymphocytes T activés attaquent directement les cellules du greffon et causent une lyse cellulaire (par exemple, l'activité CTL par les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques) ou ils produisent des cytokines qui vont recruter et activer des cellules inflammatoires (par exemple, les macrophages), causant ainsi la mort irréversible des cellules du greffon. En outre, cette nécrose des cellules parenchymateuses de l'allogreffe n'est pas sans s'accompagner de répercussions néfastes additionnelles. En effet, le processus de

nécrose cellulaire s'accompagne toujours d'une réponse inflammatoire qui participe directement au processus de rejet aigu d'allogreffe. Ceci est un bel exemple de collaboration entre l'immunité innée (processus d'inflammation) et l'immunité adaptative (mécanismes effecteurs du rejet aigu d'allogreffe). La destruction des cellules allogéniques du greffon est très spécifique, une caractéristique fondamentale de la mort cellulaire causée par les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ (activité CTL). Par contre, ce sont les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ qui jouent un rôle primordial dans le développement et le maintien du rejet aigu. On les considère comme les chefs d'orchestre de la réponse immune contre les allogreffes puisqu'ils possèdent la capacité de recruter d'autres cellules immunitaires en sécrétant des cytokines proinflammatoires, et ainsi induire des réactions similaires aux réactions d'hypersensibilité de type retardé dans le greffon. Certaines évidences rapportent même que les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ sont suffisants pour induire et maintenir le rejet aigu. En effet, Yamada et al. (1999) ont démontré que des souris CD8⁺ *knock-out* sont capables de rejeter une allogreffe cornéenne, et que les lymphocytes T CD4⁺ sont suffisants pour maintenir le rejet aigu. Les anticorps produits par les lymphocytes B peuvent également participer au rejet aigu après que le receveur engendre une réponse immune de type humoral contre les alloantigènes exprimés au niveau des vaisseaux sanguins. Les lymphocytes B activés et différenciés en plasmocytes produisent des anticorps spécifiques contre l'allogreffe. Ces anticorps se lient ensuite à l'endothélium vasculaire du greffon et activent le complément. La destruction de la vasculature de l'allogreffe s'en suit, voire l'athérosclérose d'allogreffe se développe (Krensky, 2001; Sanfilippo et al., 1997). Le rejet aigu de type humoral est caractérisé par une nécrose transmurale des vaisseaux sanguins de l'allogreffe avec présence d'une inflammation (Abbas et al., 2000). L'athérosclérose d'allogreffe est seulement observée lors de transplantation d'organes vascularisés. Dans une telle situation, les cellules endothéliales sont les premières cibles cellulaires du processus de rejet aigu. Tel qu'observé en clinique, les épisodes précoces de rejet aigu sont fréquemment accompagnés d'endothélites microvasculaires au niveau de l'allogreffe (Krensky, 2001). La phase précoce du rejet aigu est également caractérisée

par des dommages au niveau de l'endothélium et de l'intima des artères moyennes, et ces manifestations demeurent l'ultime prédictateur de la défaillance aiguë et irréversible de l'allogreffe (Nickel et al., 1998).

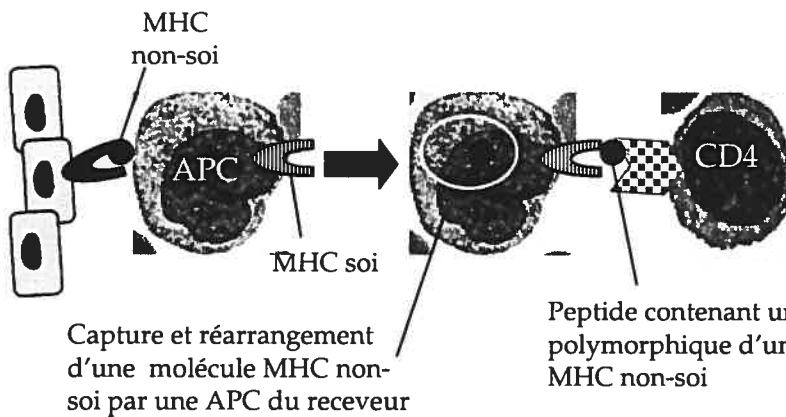
Le rejet aigu d'allogreffe demeure un des obstacles majeurs en transplantation d'organes solides. Ce processus immunitaire est très complexe, et il implique plusieurs types cellulaires (lymphocytes T et B, macrophages, monocytes, cellules NK, neutrophiles, basophiles, éosinophiles, etc.), différents mécanismes effecteurs de l'immunité adaptative (activité CTL, production d'anticorps spécifiques) et de l'immunité innée (réponse inflammatoire, complément, ADCC) (Figure 1.2.4). Dans cette thèse de doctorat, nous mettrons une emphase particulière sur trois types cellulaires qui jouent un rôle primordial dans la pathogenèse du rejet aigu d'allogreffe: 1) les lymphocytes T, 2) les lymphocytes B, et 3) les cellules endothéliales, puisque les agents immunosuppresseurs évalués agissent principalement sur ces éléments du système immunitaire.

FIGURE 1.2.1. Présentation allogénique directe et indirecte

A. PRÉSENTATION ALLOGÉNIQUE DIRECTE

Lymphocyte T alloréactif
spécifique contre une
molécule MHC non-soi

**Présentation directe d'une
molécule MHC allogénique
par une APC dans le greffon**

B. PRÉSENTATION ALLOGÉNIQUE INDIRECTE

**Présentation d'un peptide
arrangé provenant d'une
molécule MHC allogénique
liée à une molécule MHC soi**

Cellule spécifique contre un
peptide polymorphique d'une
molécule MHC non-soi

Capture et réarrangement
d'une molécule MHC non-
soi par une APC du receveur

Peptide contenant une séquence
polymorphique d'une molécule
MHC non-soi

MHC, complexe majeur d'histocompatibilité; APC, cellule présentatrice d'antigène.

Reproduit et modifié de Abbas et al., 2000.

FIGURE 1.2.2. Rôle des cellules présentatrices d'antigènes dans le rejet d'allogreffe

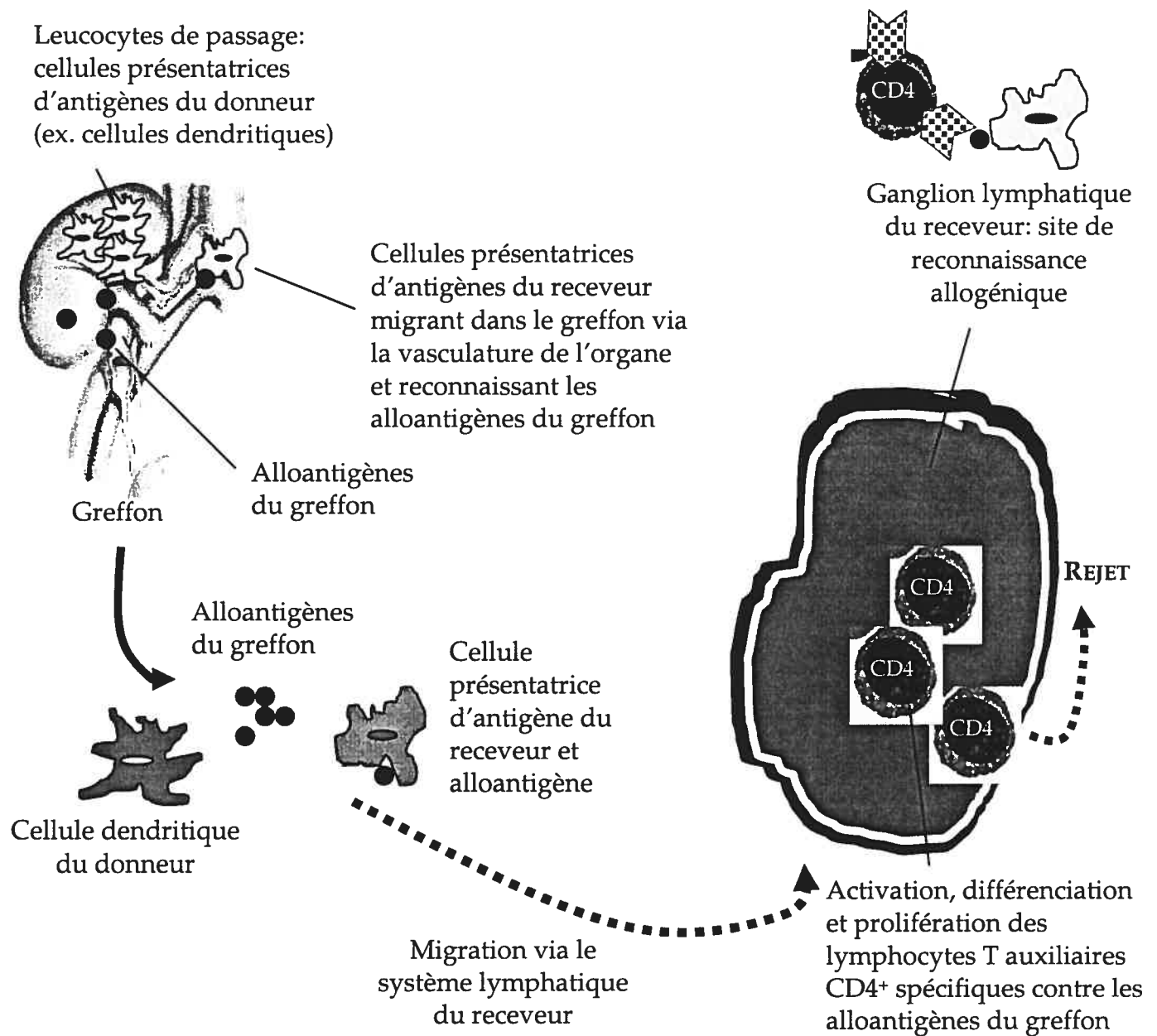
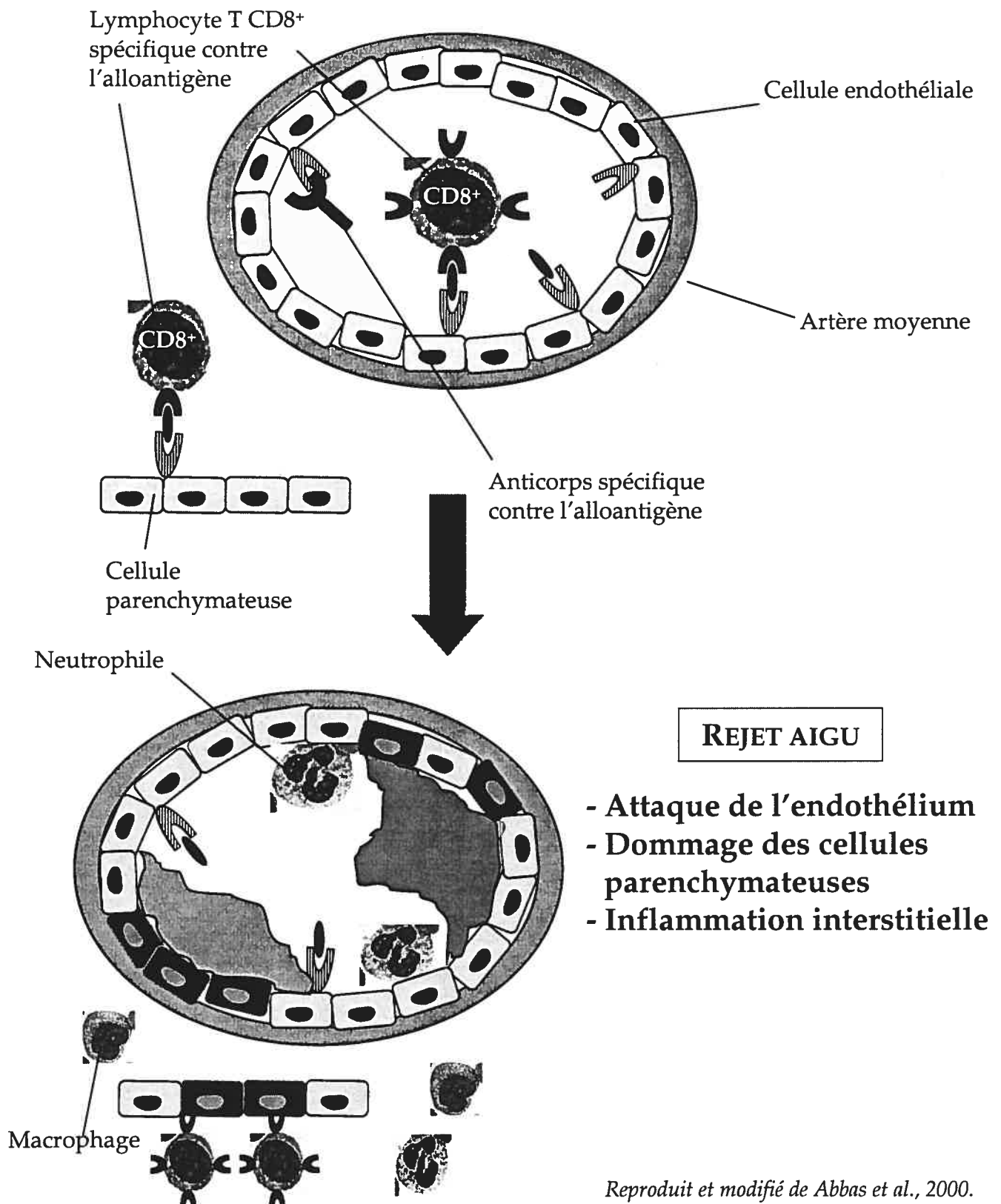
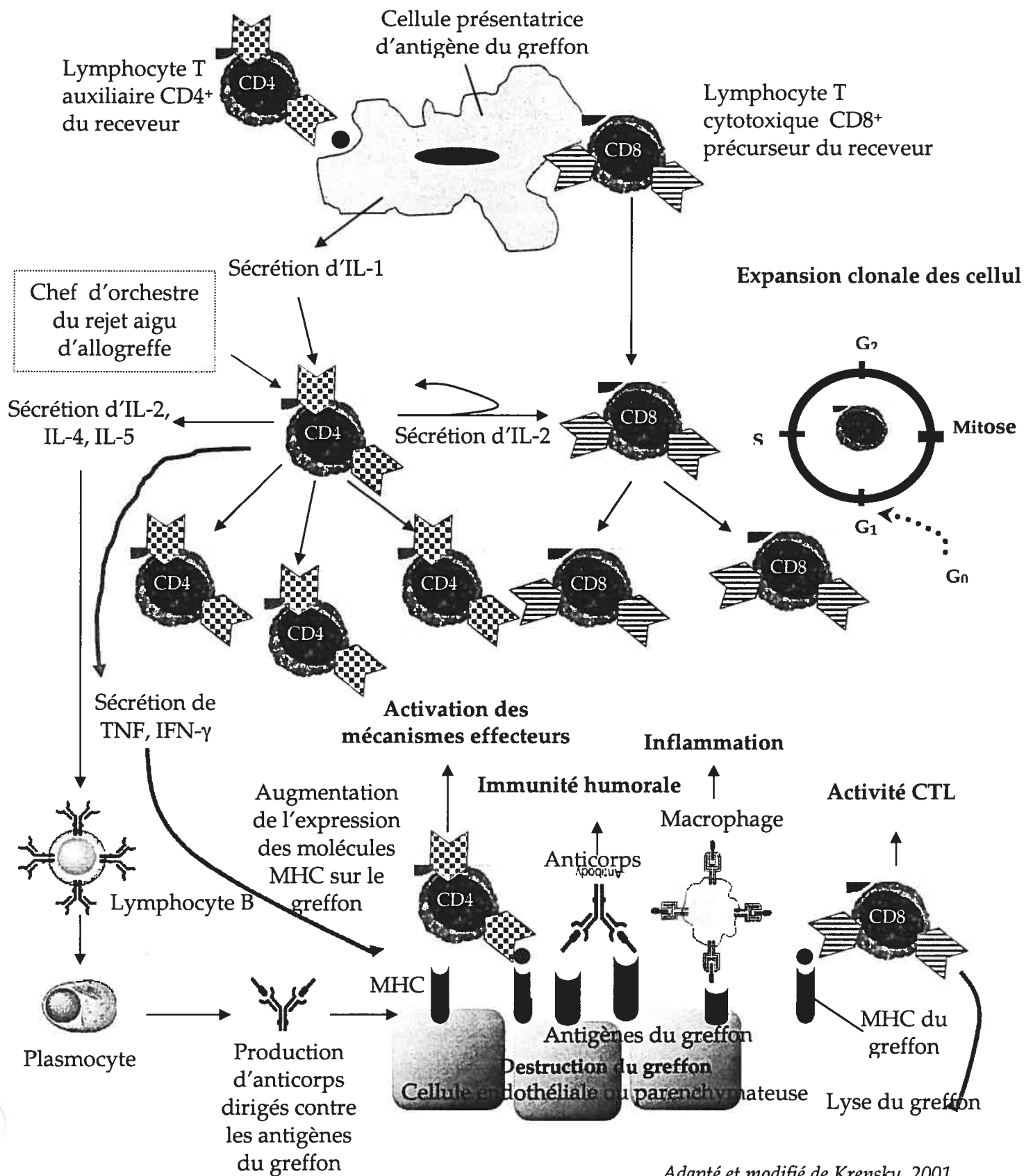


FIGURE 1.2.3. Mécanismes immunitaires du rejet aigu d'allogreffe vascularisée



Reproduit et modifié de Abbas et al., 2000.

FIGURE 1.2.4. Événements cellulaires du rejet aigu d'allogreffe



Adapté et modifié de Krensky, 2001.

1.3 PATHOGENÈSE DU REJET AIGU D'ALLOGREFFE: UN « MÉNAGE À TROIS » EXPLOSIF!

Rôle du lymphocyte T dans le rejet aigu d'allogreffe

Activation du lymphocyte T. Les lymphocytes T sont les principales cellules immunitaires à jouer un rôle dans le rejet aigu. L'activation du lymphocyte T se manifeste normalement en trois étapes (Figure 1.3.1): 1) Le signal 1 consiste en l'interaction de la molécule MHC d'une cellule présentatrice d'antigène et du TCR d'un lymphocyte T; 2) Le signal 2 représente les interactions entre les paires de molécules de costimulation exprimées sur la cellule présentatrice d'antigène et le lymphocyte T; et 3) Le signal 3 symbolise l'effet des cytokines produites sur la prolifération et la différenciation du lymphocyte T (Arakelov et al., 2000; Kahan, 2002).

1) Signal 1: L'événement initial de l'activation du lymphocyte T est la liaison du TCR et de la molécule MHC liée à un peptide allogénique. Suite à l'interaction du TCR et de la molécule MHC, la chaîne ζ du TCR se lie de manière non covalente à la molécule de surface membranaire CD3, et le TCR est alors capable d'émettre une série d'événements intracellulaires dans le lymphocyte T (Cantrell, 1996). De plus, les molécules CD4 ou CD8 exprimées à la surface du lymphocyte T peuvent se lier aux régions non polymorphiques de la molécule MHC de classe II ou I, respectivement, pour accentuer davantage l'émission des signaux de transduction via l'interaction du complexe TCR/CD3 (Cantrell, 1996). Néanmoins, l'interaction entre les molécules MHC et TCR/CD3 n'est point suffisante pour permettre l'activation, la prolifération et la différenciation du lymphocyte T naïf en lymphocyte T auxiliaire CD4⁺ ou lymphocyte T cytotoxique CD8⁺ (Kahan, 2000). La présence de molécules de costimulation exprimées à la surface des lymphocytes T demeure obligatoire à la prolifération des lymphocytes T (Sayegh et al., 1998).

2) Signal 2: La notion de costimulation consiste en l'interaction entre des molécules de costimulation exprimées sur le lymphocyte T (par exemple, CD28 sur le lymphocyte T au repos, et CD40L sur le lymphocyte T activé) et leurs ligands respectifs exprimés sur la cellule présentatrice d'antigène (par exemple, B7-1

(CD80), B7-2 (CD86) et CD40L). Grakoui et al. (1999) ont récemment démontré l'importance des voies de costimulation dans la formation d'une liaison stable entre le lymphocyte T et la cellule présentatrice d'antigène. Les auteurs soutiennent que cette liaison stable qu'ils ont nommée « synapse immunologique » est primordiale dans le processus de prolifération du lymphocyte T, puisqu'elle permet une forte, stable et suffisamment longue interaction entre le TCR du lymphocyte T et le complexe molécule MHC/peptide. Il existe plusieurs molécules de costimulation mais les paires de molécules les mieux étudiées à date demeurent les complexes CD28/B7-1 ou B7-2 et CD40L/CD40. Lenschow et al. (1996) ont d'ailleurs démontré l'importance de l'interaction des molécules CD28 et B7 dans l'initiation et la régulation dans la réponse immune allogénique. Les auteurs rapportent qu'un blocage de la voie de signalisation émise par le complexe CD28/B7 à l'aide d'un antagoniste de CD28 résulte non seulement en la suppression de la réponse immune, mais peut aussi induire une tolérance spécifique contre l'alloantigène. Dans le contexte de la transplantation, il a été démontré que la voie de costimulation CD28/B7 joue un rôle important dans le rejet d'allogreffe. En effet, plusieurs groupes rapportent que la protéine de fusion, recombinante, CTLA4-Ig, qui lie fortement B7-1 et B7-2 et qui empêche leur interaction avec CD28, permet de prolonger significativement la survie des allogreffes dans différents modèles de transplantation chez l'animal (Sayegh et al., 1998; Shiraishi et al., 2002; Malm et al., 2002). À la surface du lymphocyte T activé, on retrouve la molécule de costimulation CD40L qui interagit avec son ligand respectif CD40, une glycoprotéine retrouvée à la surface de la cellule présentatrice d'antigène et la cellule endothéliale (Foy et al., 1996). Il a été rapporté que la voie de costimulation CD40L/CD40 est primordiale dans le rejet d'allogreffe (Arakelov et al., 2000). En effet, des études effectuées chez des primates non humains démontrent qu'un anticorps monoclonal bloquant la voie de costimulation CD40/CD40L permet de prolonger significativement la survie des allogreffes rénales (Kirk et al., 1999). Cette voie de costimulation a été démontrée à induire plusieurs mécanismes immuns incluant l'activation des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires, l'activité CTL par l'activation des lymphocytes T CD8⁺

précurseurs en lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (Bennett et al., 1998; Schoenberger et al., 1998), la réponse humorale adaptative par l'activation des lymphocytes B précurseurs en plasmocytes capables de sécréter des anticorps de type IgG spécifiques contre l'alloantigène (Dadgostar et al., 2002), et la réponse inflammatoire par l'activation des macrophages, monocytes et cellules endothéliales (Grewal et al., 1998). Il existe également d'autres molécules de costimulation à la surface des lymphocytes T telles que LFA-1, CD2, CD45, 4-1BB, HSA et ICOS. Ces molécules, récemment découvertes, ont été rapportées à être impliquées dans les réponses allogéniques, et possiblement dans le rejet d'allogreffe (Arakelov et al., 2000). Il est intéressant de noter que puisque la costimulation est nécessaire dans l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T, plusieurs équipes de recherche étudient l'implication de ces molécules de costimulation dans l'induction de la tolérance.

3) Signal 3: Le signal 3 implique les cytokines ou facteurs de croissance du lymphocyte T. Bien que les cytokines sont reconnues à jouer un rôle de médiateurs solubles dans la réponse immune, ce n'est que tout récemment que la notion du signal 3 a été introduite comme une des trois étapes nécessaires à l'activation du lymphocyte T. Li et al. (2003) ont récemment rapporté l'importance des facteurs de croissance du lymphocyte T dans l'activation des lymphocytes T, l'homéostasie et l'apoptose des lymphocytes T, le rejet d'allogreffe, la tolérance de l'allogreffe et la régulation des lymphocytes T dans l'induction de la tolérance. Ces facteurs de croissance du lymphocyte T (par exemple, l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15 et l'IL-21) possèdent un récepteur qui interagit avec la chaîne γ du récepteur IL-2R pour émettre un signal intracellulaire. L'IL-2 est une cytokine de type Th1 qui joue un rôle très important dans le rejet aigu. Sécrétée majoritairement par les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺, elle est le facteur de croissance des lymphocytes T stimulés par l'alloantigène, et elle est responsable de l'expansion clonale (activation, prolifération et différenciation) des lymphocytes T spécifiques contre cet alloantigène. En outre, l'IL-2 induit la prolifération et la différenciation des lymphocytes B et des cellules NK, et elle provoque la mort par apoptose chez certains lymphocytes T activés par l'alloantigène (Krensky, 2001; Abbas et al., 2000). En effet, une stratégie

immunosuppressive efficace consiste à inhiber la production ou la fonction de l'IL-2 (par exemple, les inhibiteurs de la calcineurine et de mTOR [*mammalian target of rapamycin*], et les anticorps contre le récepteur IL-2R). L'IL-4 est une cytokine de type Th2 sécrétée par les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺, et elle est la principale cytokine qui favorise la différenciation chez les lymphocytes B à produire des anticorps de type IgE. De plus, l'IL-4 stimule le développement des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en lymphocytes T de type Th2, et elle fonctionne comme facteur de croissance autocrine pour les lymphocytes T alloréactifs (Krensky, 2001; Abbas et al., 2000). L'IL-7 joue un rôle crucial dans le développement des lymphocytes T dans le thymus (Von Freeden-Jeffry et al., 1995). L'IL-9 n'a qu'un rôle secondaire dans la prolifération des lymphocytes T, mais il a été démontré à être un facteur de croissance pour les mastocytes (Townsend et al., 2000). Dans une élégante étude, Strom et son équipe ont démontré que l'IL-15 régule le processus d'activation des lymphocytes T sous des aspects distincts de la régulation de l'IL-2, dans un modèle *in vivo*. En effet, les auteurs rapportent que l'IL-15 semble être un facteur de croissance essentiel à l'initiation de la division cellulaire du lymphocyte T, tandis que l'unique rôle *in vivo* de l'IL-2 est de contrôler l'intensité de l'expansion clonale régulée par l'expression des chaînes γ à la surface des lymphocytes T entrant dans le cycle cellulaire (Li et al., 2001). L'IL-21 a été démontrée à stimuler l'activité cytolytique des lymphocytes T CD8⁺ et des cellules NK, et à jouer un rôle fondamental dans la régulation de l'immunité innée à l'immunité adaptative (Kasaian et al., 2002). De plus, il semble que l'IL-21 soit une cytokine de type Th2 capable d'inhiber la production d'IFN- γ par les cellules de type Th1 (Wurster et al., 2002). Puisque le rejet aigu d'allogreffe est une réponse immune complexe qui n'implique pas seulement les lymphocytes T, plusieurs autres cytokines peuvent jouer un rôle direct ou indirect dans l'initiation et le maintien du rejet aigu d'allogreffe. Notamment, on retrouve les cellules proinflammatoires qui ont été démontrées à participer à la réponse immune contre l'allogreffe. Le tableau 1.3.1 résume l'implication des cytokines et chimiokines les plus importantes dans le rejet d'allogreffe (Krensky, 2001; Annexe 3). Malgré l'importance des molécules de costimulation (signal 2) et des facteurs de croissance du lymphocyte T

(signal 3), certains auteurs croient que l'activation et la prolifération du lymphocyte T puisse quand même se produire en l'absence d'un de ces signaux.

Signalisation intracellulaire du lymphocyte T. Les voies biochimiques de la signalisation intracellulaire du lymphocyte T incluent plusieurs enzymes dont des protéines kinases, des phospholipases, et des phosphatases dont la calcineurine qui est une phosphatase dépendante du calcium (Cantrell, 1996). L'enchaînement de ces signaux biochimiques chez le lymphocyte T résulte en l'activation transcriptionnelle de gènes particuliers permettant l'entrée des lymphocytes T dans le cycle cellulaire. Les gènes exprimés chez le lymphocyte T codent pour plusieurs protéines initiatrices des réponses biologiques et des fonctions du lymphocyte T (Figure 1.9.3). Il existe plusieurs récepteurs à la surface cellulaire du lymphocyte T qui jouent un rôle important dans la signalisation intracellulaire lors de son activation. Notamment, on retrouve le TCR, l'IL-2R et le CD28. Ces récepteurs sont d'ailleurs la cible de plusieurs agents immunosuppresseurs. Dans cette thèse de doctorat, nous ne discuterons que du TCR et de l'IL-2R, puisque les agents immunosuppresseurs étudiés interfèrent avec les voies biochimiques sous-jacentes à ces récepteurs. TCR: Suite à la reconnaissance allogénique, il se produit un regroupement du complexe TCR et des corécepteurs CD4/CD8. Comme le TCR ne possède pas d'activité enzymatique intrinsèque, il doit recruter des protéines associées (par exemple, les molécules CD4/CD8 et CD3, etc.) et induire leur activité enzymatique afin d'exercer ses propres fonctions. La tyrosine kinase Lck associée à la portion cytoplasmique des corécepteurs CD4/CD8 devient activée, et phosphoryle les tyrosines présentes sur les séquences peptidiques ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) du CD3 ou des chaînes ζ . La molécule ZAP-70 se lie aux phosphotyrosines des chaînes ζ et s'active par autophosphorylation (Cantrell, 1996). La molécule ZAP-70 activée phosphoryle ensuite les tyrosines présentes sur plusieurs molécules adaptatrices (par exemple, LAT et SLP-76). En effet, il a récemment été démontré à que le tacrolimus et la cyclosporine interfèrent avec LAT, une protéine adaptatrice essentielle à l'activation du lymphocyte T (Cho et al., 2002).

Ces molécules adaptatrices deviennent des sites de recrutement pour des enzymes cellulaires comme la phospholipase $\text{C}\gamma 1$ ($\text{PLC}\gamma 1$) et les membres de la famille Ras et Rac, et ces enzymes vont activer différentes réponses cellulaires (Cantrell, 1996; Abbas et al., 2000). La $\text{PLC}\gamma 1$ activée va hydrolyser la phospho-inositol-diphosphate (PIP_2) présente dans la bicouche lipidique membranaire en inositol-triphosphate (IP_3) et diacylglycérol (DAG). L' IP_3 va stimuler DAG, qui va activer à son tour la PKC. La PKC va phosphoryler la sous-unité I κ B du facteur de transcription NF κ B. La sous-unité I κ B à l'état phosphorylé se détache de NF κ B. NF κ B devient activé et traverse la membrane nucléaire pour réguler l'expression génique de plusieurs gènes de cytokines (par exemple, myc, fos, jun) impliquées dans l'activation du lymphocyte T (Cantrell, 1996; Abbas et al., 2000). Après l'activation de l'enzyme $\text{PLC}\gamma 1$ et de l'hydrolyse du PIP_2 en IP_3 , l' IP_3 peut également se lier aux récepteurs sur le réticulum endoplasmique et provoquer la libération des réserves calciques voire causer une augmentation du calcium intracellulaire (de 100 nM à 600-1000 nM) (Ward et al., 1992). L'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire permet l'activation de la calcineurine. Les ions calciques se lient à la calmoduline, une protéine régulatrice, et le complexe Ca^{2+} /calmoduline va activer la calcineurine, une protéine sérine/thréonine phosphatase. La calcineurine activée va déphosphoryler le facteur de transcription cytosolique NFAT (*nuclear factor of activated T cell*). NFAT déphosphorylé devient actif et possède la capacité de migrer vers le noyau, où sa fonction est de réguler l'expression génique de plusieurs gènes impliqués dans l'activation du lymphocyte T (par exemple, les gènes de l'IL-2, l'IL-4, et du TNF) (Cantrell, 1996; Abbas et al., 2000). Cette voie biochimique de la signalisation intracellulaire de l'activation du lymphocyte T est d'ailleurs une des cibles principales des agents immunosuppresseurs actuels. En effet, la cyclosporine et le tacrolimus exercent leurs effets immunosuppresseurs via le blocage de la calcineurine (Bierer, 1994). Il existe trois facteurs de transcription qui jouent un rôle primordial dans l'activation du lymphocyte T suite à la reconnaissance allogénique via le TCR: l'AP-1, le NFAT et le NF κ B (Cantrell, 1996; Abbas et al., 2000). Le facteur de transcription AP-1 est composé des protéines c-Fos et c-Jun, et il est présent chez plusieurs types cellulaires,

mais plus particulièrement chez les lymphocytes T activés via le TCR (Kvanta et al., 1992). Jain et al. (1992) ont d'ailleurs identifié et analysé les sites de AP-1 sur le promoteur de l'IL-2. Le facteur de transcription NFAT est requis pour l'expression de plusieurs gènes de cytokines comme l'IL-2, l'IL-4, et le TNF (Rao, 1994). Le facteur de transcription NF κ B est activé suite aux signaux engendrés par le TCR, et il est essentiel dans l'induction des réponses immunes et inflammatoires (Hayashi et al., 2000). Il existe notamment d'autres facteurs de transcription qui peuvent jouer un rôle dans l'activation du lymphocyte T (par exemple, Oct-1), cependant les facteurs de transcription AP-1, NFAT et NF κ B sont essentiels à l'activation, la prolifération et la différenciation du lymphocyte T.

IL-2R: L'IL-2R est formé de trois sous-unités qui lui confèrent la propriété de se lier avec les cytokines (chaînes α et β) et d'émettre des signaux de transduction (chaînes β et γ) (Ellery et al., 2002). Lorsque l'IL-2 est produite par un lymphocyte T auxiliaire CD4⁺, la cytokine se lie à l'IL-2R qui exprimé à la surface du lymphocyte T naïf ou activé. L'interaction des chaînes β et γ de l'IL-2R avec des protéines tyrosines kinases (par exemple, les familles SRC et JAK) peut déclencher une cascade d'événements biochimiques et l'activation de facteurs de transcription importants dans l'activation du lymphocyte T (par exemple, c-jun, c-fos et c-myc), des cyclines importantes dans le cycle cellulaire (par exemple, cdk2/cycline E, p34cdc2/cycline A) (Sehgal et al., 1995; Ellery et al., 2002). De plus, les voies de la MAP kinase et de la P70S6 kinase sont activées. Ces voies biochimiques jouent un rôle important dans la synthèse des protéines. Par exemple, la P70S6 kinase est responsable de la phosphorylation de la protéine ribosomale S6, qui à son tour est responsable de la transcription d'importantes protéines de régulation du cycle cellulaire. Le sirolimus a été démontré à inhiber cette voie biochimique (Chung et al., 1992). Les facteurs de transcription représentent des cibles par excellence pour des agents immunosuppresseurs. En effet, bien des molécules immunosuppressives actuellement utilisées en clinique exercent leurs propriétés antiprolifératrices sur le lymphocyte T via l'inhibition des voies de signalisation en amont de ces facteurs de transcription. On

retrouve notamment les agents comme la cyclosporine, le tacrolimus et le sirolimus, lesquels nous discuterons plus en détails de leurs mécanismes d'actions.

Fonctions effectrices du lymphocyte T. Les lymphocytes T sont les cellules les plus importantes dans le rejet aigu, surtout lors de l'initiation de la réponse immune contre l'allogreffe. Lymphocyte T CD4⁺ auxiliaire: Le lymphocyte T CD4⁺ auxiliaire jouent un rôle primordial dans la reconnaissance allogénique. Après avoir reconnu les molécules MHC de type II exprimées sur l'allogreffe, les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires du receveur deviennent activés, prolifèrent, se différencient et sécrètent une variété de cytokines (Krensky et al., 1990). Ces cytokines causent une augmentation de l'expression des molécules MHC allogéniques au niveau de l'endothélium vasculaire de l'allogreffe, stimulent les lymphocytes B à devenir des plasmocytes capables de sécréter des anticorps spécifiques contre l'allogreffe, et induisent les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques, les macrophages et les cellules NK à initier les mécanismes de cytotoxicité contre l'allogreffe. Il est donc approprié de surnommer le lymphocyte T CD4⁺ auxiliaire comme étant le chef d'orchestre, le « *Charles Dutoit* », du rejet aigu d'allogreffe. Même si le lymphocyte T CD4⁺ auxiliaire ne joue pas de rôle direct dans la destruction de l'allogreffe, il dirige les autres types de cellules immunitaires à initier les mécanismes effecteurs contre le greffon. Les fonctions biologiques principales du lymphocyte T CD4⁺ auxiliaire dans le rejet aigu sont la reconnaissance allogénique, la costimulation et la sécrétion de cytokines de type Th1 (par exemple, l'IL-1 et l'IFN- γ) et de type Th2 (par exemple, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6 et l'IL-10) (Mosmann et al., 1989). Les cytokines Th1 sont des cytokines proinflammatoires qui stimulent la défense contre les infections virales et microbiennes par des mécanismes de l'immunité innée, et les cytokines Th2 sont des cytokines qui régulent à la baisse les réponses immunes de type Th1 en plus de stimuler la production d'anticorps IgE et les réactions immunes des mastocytes et éosinophiles (Mosmann et al., 1989). Dans les mécanismes de costimulation, le lymphocyte T CD4⁺ auxiliaire peut se lier à la cellule endothéliale ou le macrophage via les molécules de costimulation CD40/CD40L et induire leur activation (Arakelov et al., 2000). Or, une cellule endothéliale activée exprime

à sa surface des molécules de MHC allogéniques, et devient plus repérable par les lymphocytes T alloréactifs. Les macrophages activés vont sécréter des cytokines proinflammatoires et induire la réponse inflammatoire au niveau de l'allogreffe, aggravant ainsi les dommages causés par le rejet aigu. En outre, le lymphocyte T CD4⁺ auxiliaire peut stimuler les lymphocytes B à devenir des plasmocytes via la voie de costimulation CD40/CD40L (Arakelov et al., 2000). Enfin, il a été démontré que les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires jouent un rôle crucial dans le rejet aigu d'allogreffe puisque des souris knock-out déficientes en lymphocytes T CD4⁺ sont incapables de rejeter des allogreffes cardiaques (Krieger et al., 1996).

Lymphocyte T CD8⁺ cytotoxique:

Dans le rejet aigu, ce sont les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques qui sont capables de lyser directement les cellules parenchymateuses du greffon. Lorsque les lymphocytes T cytotoxiques précurseurs reconnaissent les molécules MHC de classe I, et sous l'action des cytokines et facteurs de croissance, ils se différencient en lymphocytes T cytotoxiques compétentes capables de lyser spécifiquement les cellules cibles. En effet, Strom et al. (1975; 1977) ont démontré que des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques spécifiques contre le donneur sont présents dans des allogreffes rénales en épisodes de rejet aigu chez l'humain. Il existe deux mécanismes de cytotoxicité induite par les lymphocytes T: la voie de la granzyme et perforine (voie sécrétoire) et la voie Fas/Fas-ligand (voie non sécrétoire). La voie Fas/Fas-ligand consiste en l'interaction des molécules de surface Fas (exprimée sur les cellules cibles) et Fas-ligand (exprimée sur les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques activés), causant la mort cellulaire par apoptose des cellules cibles (par exemple, les cellules parenchymateuses du greffon). Fas est une glycoprotéine transmembranaire de 48 KD qui possède des homologies avec le TNF- α et la capacité de transmettre un signal apoptotique via l'activation de la cascade des caspases (Rouvier et al., 1993). Une réaction croisée de Fas avec un anticorps monoclonal ou son ligand naturel, Fas-ligand, induit la mort cellulaire par apoptose. Contrairement à la nécrose, où la cellule entre en disruption métabolique aiguë et dont les enzymes destructrices activés provoquent une réponse inflammatoire, l'apoptose est une mort cellulaire programmée qui requiert de l'énergie (ATP) et qui est caractérisée par une fragmentation de l'ADN

nucléaire, voire une résorption cellulaire sans qu'il y ait d'inflammation ou de détérioration du métabolisme cellulaire (Susin et al., 1998). Dans une étude utilisant un modèle de transplantation cardiaque chez la souris, Larsen et al. (1996) ont démontré que les allogreffes et les isogreffes cardiaques exprimaient de manière constitutive Fas, mais que l'expression de Fas-ligand était significativement à la hausse que dans les allogreffes rejetées. Cependant, les auteurs rapportent que l'absence d'une voie Fas/Fas-ligand intacte n'altère pas le tempo du rejet aigu, et suggèrent que cette voie non sécrétoire joue un rôle plus important dans la régulation de la prolifération des lymphocytes T que dans le mécanisme de cytotoxicité lors de la réponse immune contre l'allogreffe. Van Parijs (1998) a d'ailleurs suggéré que la mort apoptotique des lymphocytes T par l'interaction Fas/Fas-ligand (un processus aussi appelé *activation-induced cell death*) est un mécanisme crucial pour l'élimination des lymphocytes T autoréactifs dans la tolérance aux antigènes du soi. D'autre part, la voie sécrétoire de la granzyme et perforine est, sans équivoque, le mécanisme principal de cytotoxicité contre l'allogreffe. Dans une élégante étude menée par Suthanthiran (1997), l'auteur rapporte qu'il existe une corrélation directe entre l'expression de l'ARN messager de la granzyme B et de la perforine dans l'allogreffe et le rejet aigu chez des patients transplantés rénaux. De manière intéressante, la même corrélation est observée avec le rejet chronique. En outre, des études effectuées chez la souris knock-out du gène de la perforine démontrent que ces souris sont incapables d'induire une lyse spécifique contre des cellules infectées *in vitro* ou contre une infection virale *in vivo* (Kagi et al., 1994). La voie de la granzyme et perforine consiste en la sécrétion de granules contenant des molécules de perforine (semblable au complément), de granzyme (enzyme sérine protéase et estérase) et de granulysine (une molécule à action lytique) (Krensky, 2001). Dans la voie sécrétoire, la sécrétion des granules cytolytiques spécifiques est dépendante du calcium intracellulaire des lymphocytes T cytotoxiques. Cette libération de perforines et de granzymes dans l'espace intercellulaire entre le lymphocyte T cytotoxique et la cellule cible permet la lyse de la cellule cible tout en épargnant la cellule effectrice. Les granzymes pénètrent dans la cellule cible à travers des pores causés par les perforines. Les granzymes induisent une mort apoptotique,

caractérisée par une fragmentation de l'ADN, en interrompant le processus normal du cycle cellulaire. Les perforines peuvent également causer une lyse osmotique en formant de larges pores à la membrane cellulaire des cellules cibles (Pattison et al., 1997).

Rôle du lymphocyte B dans le rejet aigu d'allogreffe

Il existe de plus en plus d'études démontrant l'importance des lymphocytes B, des anticorps et du complément dans le rejet de greffe de types aigu, chronique et xénogénique (Baid et al., 2001; Sumitran-Holgersson, 2001; Sanfilippo et al., 1997). Dans cette thèse de doctorat, nous discuterons plus en particulier de l'implication de la réponse humorale dans le rejet aigu d'allogreffe, mais il est intéressant de garder en perspective que l'immunité humorale joue un rôle direct dans la pathogenèse du rejet chronique et de xénogreffe.

Activation du lymphocyte B. Dans la réponse immune contre l'allogreffe, les lymphocytes B sont impliqués dans les mécanismes effecteurs du rejet aigu. Les lymphocytes B expriment à leur surface des molécules d'immunoglobulines (Ig) qui fonctionnent autant comme des récepteurs spécifiques à l'alloantigène que des molécules effectrices. Les lymphocytes B précurseurs sont stimulés par des antigènes spécifiques, et sous l'action des facteurs de croissance sécrétés par les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires (par exemple, l'IL-4 et l'IL-5), ils deviennent des plasmocytes capables de sécréter une grande quantité d'anticorps solubles spécifiques contre l'alloantigène. La réponse humorale se divise en deux phases: la phase de reconnaissance et la phase d'activation. Puisque des lymphocytes B exprimant à leur surface des IgM et IgG se développent dans la moelle osseuse sans qu'il n'y ait de stimulation allogénique, on retrouve ces lymphocytes B, capables de reconnaître des alloantigènes spécifiques, dans les organes lymphoïdes secondaires (par exemple, les ganglions lymphatiques et la rate). La phase de reconnaissance se caractérise par le rencontre d'un lymphocyte B de type IgM ou IgD inactivé avec un alloantigène. Suite à leur interaction et sous l'action des cytokines produits par les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires, le lymphocyte B devient

activé et entre en expansion clonale. Dans le cas d'une première exposition à l'alloantigène (tel que rencontré en transplantation, à l'exception des patients présensibilisés), le processus d'activation du lymphocyte B prend environ une semaine (Abbas et al., 2000). La phase d'activation consiste en la prolifération (expansion clonale) et la différenciation du lymphocyte B. Cette phase d'activation résulte en la génération de cellules effectrices (plasmocytes) capables de sécréter des anticorps spécifiques contre l'alloantigène ainsi que des lymphocytes B mémoires. Cela prend environ 10 jours avant que les lymphocytes B ne deviennent des plasmocytes, et les lymphocytes B mémoires générés peuvent vivre pendant plusieurs années dans la moelle osseuse. Dans le cas d'une seconde exposition à l'alloantigène (par exemple, chez des patients présensibilisés), la réponse humorale contre l'allogreffe est beaucoup plus intense et rapide (Abbas et al., 2000). Il est donc très important d'évaluer chez le receveur, les taux d'anticorps allogéniques spécifiques contre le donneur, avant la transplantation afin d'éviter tout rejet de type hyperaigu (Sumitran-Holgersson, 2001).

Signalisation intracellulaire du lymphocyte B. Tout comme le lymphocyte T, le lymphocyte B exprime à sa surface des récepteurs qui sont impliqués dans les voies biochimiques de la signalisation intracellulaire (Figure 1.3.3). Un complexe récepteur a été identifié à jouer un rôle primordial dans la réponse contre l'alloantigène et le développement du lymphocyte B: le BCR (*B cell receptor*) (Kurosaki et al., 1999) et son corécepteur CD19 (Engel et al., 1995). De manière similaire à la transduction des signaux du lymphocyte T, les voies biochimiques précoces induites par l'interaction entre l'alloantigène et les récepteurs membranaires comportent plusieurs enzymes dont des protéines tyrosines kinases (par exemple, Btk [*Bruton's tyrosine kinase*] et Syk), des phospholipases et des phosphatases. Le BCR est une protéine composée d'une immunoglobuline membranaire (mIg), qui représente le site de liaison antigénique, associée à deux éléments de transduction de signaux Ig- α (CD79a) et Ig- β (CD79b) (Kurosaki, 1999). Lorsque l'alloantigène se lie au BCR au niveau du site mIg, il se produit la phosphorylation des motifs ITAMS présents sur les éléments Ig- α et Ig- β par

les protéines kinases de la famille Src comme Lyn, Fyn et Blk (Gauld et al., 2002). Ceci permet le recrutement de la tyrosine kinase Syk, qui a été démontrée à permettre l'activation et l'initiation de la cascade de signalisation intracellulaire en aval (Cornall et al., 2000). De nombreuses molécules cytoplasmiques retrouvées près du BCR ont été identifiées à jouer un rôle essentiel dans les fonctions biologiques et le développement du lymphocyte B. Par exemple, il a été démontré que des souris déficientes en tyrosine kinase Lyn ont une difficulté à maintenir une population mature de lymphocytes B dans les organes lymphoïdes secondaires, mais pas dans la moelle osseuse (Meade et al., 2002). De plus, Cheng et al. (1995) ont démontré que des souris déficientes en tyrosine kinase Syk expriment un blocage précoce durant le développement du lymphocyte B. Enfin, il a été rapporté que la protéine kinase Btk est impliquée dans le développement du lymphocyte B, puisqu'une mutation au niveau du gène Btk cause des immunodéficiences sévères comme l'agammaglobulinémie X chez l'humain et xid chez la souris (Smith et al., 1997). Une autre voie biochimique importante activée par le BCR est la voie qui implique la 3-phosphoinositol kinase (PI_3) kinase. La PI_3 kinase est responsable de la phosphorylation de la phosphatidylinositol biphosphate (PIP_2) en phosphatidylinositol triphosphate (PIP_3). La PIP_3 a un effet sur d'autres molécules importantes dans la transduction des signaux comme Btk (Nore et al., 2000), Akt et $PLC\gamma_2$, qui est responsable de la production de DAG et IP_3 . Tel que mentionné dans la cascade de signalisation du lymphocyte T, les enzymes et les éléments de transduction des signaux et les facteurs de transcription en amont aval à DAG et IP_3 incluent le Ca^{2+} , la calcineurine, PKC, NFAT, NF κ B, etc. La molécule CD19 est un corécepteur du BCR qui régule à la hausse l'intensité des signaux émis par le BCR durant l'activation du lymphocyte B (Engel et al., 1995). CD19 est exprimé à la surface cellulaire durant toute l'étape du développement du lymphocyte B. Cependant, il semble que CD19 ne possède pas un rôle crucial avant le stade mature du lymphocyte B. En effet, Engel et al. (1995) ont démontré que les souris déficientes en CD19 possèdent un nombre significativement réduit de lymphocytes B matures au niveau de la rate, tandis que les

souris transgéniques qui surexpriment le gène CD19 sont prédisposées à des maladies autoimmunes.

Fonctions effectrices du lymphocyte B. Le rôle des lymphocytes B dans le rejet aigu d'allogreffe est principalement la production d'anticorps spécifiques contre les alloantigènes exprimées à la surface des cellules endothéliales ou parenchymateuses du greffon. Ces anticorps spécifiques peuvent directement endommager l'allogreffe par deux mécanismes de l'immunité humorale, soit en se liant au complément ou en recrutant les cellules K pour induire l'ADCC (*antibody-dependent, cell-mediated cytotoxicity*). Chez des patients présensibilisés, une réponse immune de type humorale dirigée contre l'allogreffe peut survenir rapidement, en l'instant de quelques secondes, et contribuer au rejet hyperaigu. Ceci peut être dû à la présence d'anticorps préformés ou au phénomène de réaction croisée où un anticorps du receveur dirigé contre un antigène spécifique peut également reconnaître et se lier à un alloantigène du greffon.

Le complément: Il a été démontré que le complément joue un rôle important dans le rejet d'organes (Platt et al. 1999). Les fonctions effectrices du système du complément sont l'induction de la lyse cellulaire, l'opsonisation et la réponse inflammatoire (Abbas et al., 2000). Il existe deux voies d'activation du complément soit la voie classique et la voie alternative. La voie classique est caractérisée par l'interaction des anticorps avec des alloantigènes, tandis que la voie alternative est indépendante des anticorps (par exemple, en présence de microbes). Nous ne discuterons que de la voie classique puisque la voie alternative n'est pas impliquée dans le rejet d'allogreffe. *Grosso modo*, le système du complément est constitué du sérum et des protéines plasmatiques, dont l'interaction avec d'autres molécules du système immunitaire, génère d'importantes réponses effectrices de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. La voie classique du système du complément consiste en une cascade d'enzymes protéolytiques, qui cause la formation de médiateurs inflammatoires et d'un complexe cytolytique. Les activités proinflammatoires causées par le complément incluent l'activation directe des mastocytes et des neutrophiles, le chimiotactisme et l'altération de la perméabilité

vasculaire. Lorsque les anticorps spécifiques se lient à l'alloantigène sur les cellules du greffon, le complément (C1) peut se lier à la partie Fc des anticorps et former un complexe complément/anticorps à la surface des cellules cibles. Une cascade d'enzymes protéolytiques s'en suit et la formation d'un complexe cytolytique à la surface cellulaire permet la lyse osmotique de la cellule cible. En plus de la mort cytolytique, le complément peut induire une réponse inflammatoire via la formation de sous-produits C3a, C4a et C5a, aussi appelés anaphylatoxines. Ces sous-produits possèdent une activité protéolytique et ils sont générés durant les étapes précoces de l'activation du complément. Ces anaphylatoxines induisent la réponse inflammatoire en agissant sur les neutrophiles et les mastocytes. En effet, en liant aux mastocytes, C3a, C4a et C5a induisent leur dégranulation et causent la libération de médiateurs vasodilatateurs comme l'histamine et la sérotonine. La dégranulation des plaquettes peut également être causée suite à la sécrétion du facteur d'activation des plaquettes. De plus, le peptide C5a peut exercer son activité chimiotactique sur les neutrophiles, et favoriser ainsi leur forte adhérence à l'endothélium vasculaire de l'allogreffe. Le peptide C5a peut agir directement sur l'endothélium, et causer ainsi une augmentation de la perméabilité vasculaire et l'expression de molécules d'adhésion, favorisant ainsi l'interaction entre les neutrophiles et les cellules endothéliales (Kirschfink, 1999). Il a également été démontré que l'anaphylatoxine C5a peut induire la production de radicaux libres chez des neutrophiles polymorphonucléaires humains (Tiagi et al., 2000). Akizuki et al. (2000) ont d'ailleurs démontré que les niveaux d'oxyde nitrique et de superoxyde sont significativement élevés dans les allogreffes cardiaques en épisode de rejet aigu, comparativement aux isogreffes chez le rat. La combinaison des actions des anaphylatoxines sur les mastocytes, les neutrophiles et les cellules endothéliales contribue principalement à l'inflammation observée aux sites d'activation du système du complément. Pour exercer leurs effets proinflammatoires, les anaphylatoxines doivent se lier à leurs récepteurs respectifs présents sur une variété de types cellulaires incluant les basophiles, les éosinophiles, les neutrophiles, les macrophages, les monocytes, les mastocytes, les cellules épithéliales et les astrocytes (Abbas et al., 2000).

L'ADCC: Le lymphocyte B peut participer à la destruction des cellules endothéliales ou parenchymateuses de l'allogreffe via l'ADCC. L'ADCC est un processus immunitaire qui implique l'interaction entre les anticorps et la cellule NK. Des anticorps spécifiques reconnaissent et se lient aux alloantigènes à la surface des cellules du greffon. La cellule cible est alors recouverte d'anticorps à sa surface. Grâce à leur récepteur FcγRIII, les cellules NK sont capables de se lier à la partie Fc de ces anticorps. Cette interaction cause l'activation, la production de cytokines (par exemple, l'IFN-γ) et la dégranulation des cellules NK, dont les enzymes cytolytiques causent la mort de la cellule cible (Schattner et al., 1985).

Rôle de la cellule endothéliale dans le rejet aigu d'allogreffe

Il a été rapporté que les interactions entre les cellules endothéliales et les cellules immunitaires sont importantes dans le rejet d'organes. Briscoe et al. (1998) ont d'ailleurs rapporté que les interactions entre les cellules endothéliales et les lymphocytes T sont d'une importance capitale dans le rejet aigu puisque les cellules endothéliales sont responsables du recrutement des lymphocytes T dans l'allogreffe et de la régulation de l'apoptose chez les lymphocytes T, et qu'elles favorisent les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ à produire des cytokines effectrices. De plus, Steiniger et al. (2001) ont récemment suggéré que les monocytes possèdent la capacité d'exercer des effets cytotoxiques directs sur les cellules endothéliales lors du rejet aigu dans un modèle de transplantation rénale chez le rat. Enfin, il a également été rapporté que les interactions entre les cellules endothéliales et les cellules NK jouent un rôle important dans le rejet de xéno greffe (Dawson et al., 2000). Dans le cas des transplantations d'organes vascularisés, il est inévitable que l'endothélium vasculaire de l'allogreffe soit endommagé mécaniquement suite à l'anastomose des vaisseaux sanguins. Les cellules endothéliales des allogreffes vascularisées sont, sans équivoque, les premières cellules allogéniques à interagir avec les lymphocytes du receveur. L'endothélium vasculaire de l'allogreffe est impliqué dans le développement du rejet aigu causé par les lymphocytes T via deux mécanismes: le recrutement des lymphocytes T dans l'allogreffe et

l'activation des lymphocytes T alloréactifs par la reconnaissance allogénique et la costimulation. Puisque le rejet aigu est, avant tout, une réponse immune de type adapté, nous mettrons plus l'emphasis sur les interactions entre les cellules endothéliales et les lymphocytes T, mais il est quand même important de garder à l'esprit que le rejet aigu implique également des réponses immunes de type inné, comme la réponse inflammatoire, et que les interactions entre les cellules endothéliales et d'autres leucocytes sont aussi pertinentes.

Recrutement des leucocytes dans l'allogreffe. Une des caractéristiques cliniques du rejet aigu est la présence d'une infiltration cellulaire au niveau de l'allogreffe, telle qu'identifiée dans les biopsies des patients transplantés. En recherche préclinique, l'histopathologie représente un bon outil pour confirmer le rejet aigu dans les allogreffes. En général, on retrouve des lymphocytes T, des macrophages et des éosinophiles dans les allogreffes en épisode de rejet aigu (Thiru et al., 2000). Afin de détruire l'allogreffe par des mécanismes effecteurs de l'immunité adaptative et de l'immunité innée, les leucocytes activés doivent se rendre au site de l'allogreffe pour exercer leurs fonctions biologiques. Une infiltration leucocytaire au niveau du greffon implique que les leucocytes activés doivent passer de la lumière des vaisseaux sanguins de l'allogreffe vers le tissu parenchymateux de l'organe transplanté. Ce processus de recrutement leucocytaire au site de l'inflammation ou dans l'allogreffe (aussi appelé *multistep paradigm*) s'effectue en quatre étapes chronologiques dont 1) le roulement leucocytaire sur l'endothélium, 2) l'activation leucocytaire via les chimiokines, 3) la forte adhérence leucocytaire à l'endothélium et 4) la diapédèse ou migration transendothéliale (Springer, 1994). Il a d'ailleurs été démontré que les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires empruntent ce mécanisme de migration pour se rendre dans le tissu parenchymateux lors de la réponse inflammatoire et dans les allogreffes en rejet chronique (Bradley et al., 1996; Briscoe et al, 1997).

Le passage des lymphocytes T activés dans l'allogreffe implique une série de changements phénotypiques des lymphocytes et des cellules endothéliales vasculaires (Springer, 1994). Ce processus de recrutement lymphocytaire est initié par l'interaction entre le lymphocyte T et la cellule endothéliale via des molécules d'adhésion de surface (par exemple, les intégrines et sélectines) (Fuggle et al., 1998). Voici un résumé des étapes du « *multistep paradigm* » approprié à la réponse immune adaptative des lymphocytes T contre l'allogreffe (Springer, 1994) (Figure 1.3.4): 1) Roulement du lymphocyte T sur l'endothélium: En général, dans une situation physiologique normale, les leucocytes sont inactivés, et ils se déplacent librement dans la lumière des vaisseaux sanguins sans adhérer à l'endothélium. Dans un contexte de transplantation d'organes vascularisés (c'est-à-dire, où les vaisseaux sanguins du greffon sont anastomosés avec ceux du receveur), les macrophages du receveur présents dans le greffon libèrent des cytokines proinflammatoires (par exemple, l'IL-1 et le TNF- α) qui vont activer les cellules endothéliales de l'allogreffe. Les cellules endothéliales activées expriment à leur surface des molécules d'adhésion telles la E- ou P-sélectine (Fuggle et al., 1998). Un lymphocyte T circulant exprime à sa surface des molécules de L-sélectine ou PSGL-1 qui vont reconnaître et se lier aux molécules de E- ou P-sélectine, ralentir et rouler le long de l'endothélium grâce cette interaction cellulaire de faible affinité (McEver et al., 1997). Une fois adhérent à l'endothélium vasculaire, le lymphocyte T peut servir de lieu d'adhérence pour attirer et recruter d'autres cellules immunitaires via des molécules d'adhésion respectives, et ainsi amplifier le processus de recrutement et d'infiltration leucocytaire dans le greffon (phénomène de « *thetering* »). 2) Activation du lymphocyte via les chimiokines: Pour que le processus de migration continue, les lymphocytes T recrutés doivent être activés. Ce sont les chimiokines produites par les cellules endothéliales activées qui sont responsables de l'activation des lymphocytes T (par exemple, MIP-1 et MCP-1, Annexe 3). Tout récemment, El-Sawy et al. (2002) ont rapporté le rôle important des chimiokines à diriger l'infiltration leucocytaire dans les allogreffes. 3) Forte adhérence du lymphocyte T à l'endothélium: En réponse aux chimiokines, les lymphocytes T réarrangent leur cytosquelette, et passent d'une forme

sphérique à aplatie, leur conférant ainsi une plus grande motilité. L'aplatissement des lymphocytes T permet aux molécules d'intégrines VLA-4 exprimées à la surface des lymphocytes T d'interagir, avec très forte affinité, avec leurs ligands respectifs, VCAM-1, exprimés sur la cellule endothéliale (Molossi et al., 1995). L'expression de VCAM-1 à surface des cellules endothéliales est augmentée par les cytokines proinflammatoires (par exemple, l'IL-1 et le TNF- α). Lorsque les lymphocytes T adhèrent très fortement à l'endothélium vasculaire, ils commencent à migrer très lentement vers la jonction cellulaire interendothéliale. 4) Migration transendothéliale ou diapédèse: À la jonction cellulaire interendothéliale, les lymphocytes T reçoivent des signaux additionnels qui les poussent à transmigrer davantage. Le mécanisme de la migration transendothéliale est encore ambigu. Il a été démontré que la molécule d'adhésion PECAM-1 est responsable du phénomène de diapédèse des leucocytes en interaction avec les cellules endothéliales (Muller, 1995). Cependant, Weber et al. (1998) suggèrent plutôt que ce soit l'interaction entre VLA-4 et VCAM-1 qui est responsable de la diapédèse des monocytes, en facilitant leur migration latérale. Une fois dans le tissu parenchymateux, grâce à ses molécules d'intégrines VLA-4, les lymphocytes T migrent le long de la membrane basale de l'allogreffe en se liant à la fibronectine, une protéine de la matrice extracellulaire qui a été démontrée à jouer un rôle important dans l'adhésion et la migration des cellules dans des organes lymphoïdes et non-lymphoïdes (Elices et al., 1990). Il a également été démontré que l'interaction de VLA-4 et la fibronectine joue un rôle important dans le rejet aigu, puisqu'un traitement bloquant cette liaison permet de réduire l'accumulation des leucocytes dans l'allogreffe et d'inhiber l'activation des cellules endothéliales et l'expression des cytokines proinflammatoires (Coito et al., 1998). Il est à noter que dans le modèle du recrutement leucocytaire que nous venons de décrire, l'emphasis était mise sur l'interaction du lymphocyte T et de la cellule endothéliale, et des molécules d'adhésion respectives impliquées. Cependant, dans la réponse inflammatoire (immunité innée), jouant également un rôle important dans le rejet aigu d'allogreffe, les leucocytes peuvent être des monocytes ou des neutrophiles. Les molécules d'adhésion impliquées dans l'adhérence sur l'endothélium sont alors

différentes et elles impliquent les paires de molécules LFA-1 ou Mac-1/ICAM-1 (neutrophile ou monocyte/cellule endothéliale) et VLA-4/VCAM-1 (leucocyte sauf neutrophile/cellule endothéliale) (Fuggle et al., 1998).

Cellule endothéliale et lymphocyte T: un duo dynamique. Dans la partie introductrice du « rôle du lymphocyte T dans le rejet aigu d'allogreffe », nous avons effleuré la notion du rôle de la cellule endothéliale dans l'activation du lymphocyte T via le TCR (signal 2). Il a été rapporté que la cellule endothéliale peut également favoriser l'activation du lymphocyte T via la reconnaissance allogénique et la voie de costimulation CD40/CD40L. En effet, il est bien connu que la cellule endothéliale possède la propriété de se comporter comme une cellule présentatrice d'antigène dans la reconnaissance allogénique directe des molécules MHC de classe I, favorisant ainsi les mécanismes de mort cytotytique causés par les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques, et la reconnaissance directe ou indirecte des molécules MHC de classe II, activant ainsi les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires. Dans une élégante étude *in vitro*, Ma et al. (1998) ont démontré que les cellules endothéliales HUVEC sont capables de costimuler les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires à produire des cytokines effectrices comme l'IFN- γ et l'IL-4. Briscoe et al. (1997) ont également rapporté que les cellules HUVEC costiment les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires à produire l'IFN- γ , et que cet effet est augmenté davantage en présence d'IL-12. Il semble que la voie de costimulation CD40/CD40L est impliquée dans l'activation du lymphocyte T. Ainsi, les cellules endothéliales peuvent activer les lymphocytes T via la reconnaissance allogénique des molécules MHC, et en retour, les lymphocytes T activés, exprimant la molécule CD40L à leur surface, peuvent activer les cellules endothéliales en se liant à la molécule CD40 exprimée à leur surface.

Les lymphocytes T, les lymphocytes B et les cellules endothéliales sont des cellules immunitaires jouant un rôle capital dans la pathogenèse du rejet aigu d'allogreffe. Ces types cellulaires et leurs fonctions biologiques représentent d'excellentes cibles des agents immunosuppresseurs.

Autres facteurs immunitaires

Le rejet aigu est une réponse inflammatoire. Une réponse inflammatoire vigoureuse dans le greffon est une caractéristique fondamentale du rejet aigu. Les épisodes de rejet aigu sont normalement accompagnés des signes classiques de l'inflammation tels la rougeur (due à la congestion vasculaire), l'œdème, la fièvre, la douleur et la perte de fonction. Cette réponse issue de l'immunité innée est initiée par des interactions spécifiques entre les alloantigènes du donneur et les lymphocytes T du receveur. Ces interactions moléculaires spécifiques causent une réponse inflammatoire intense et très complexe, faisant appel à la participation d'une série d'éléments cellulaires amplifiés par divers médiateurs solubles proinflammatoires (Matturi et al., 1986). Ces médiateurs jouent un rôle primordial dans la pathogenèse du rejet aigu et chronique. Les médiateurs proinflammatoires qui participent au rejet aigu agissent de façons variées. En premier lieu, ils initient le recrutement et l'accumulation des cellules proinflammatoires dans l'allogreffe. Ensuite, ils peuvent agir directement sur les lymphocytes T et moduler leurs fonctions. Enfin, la réponse inflammatoire est un important mécanisme effecteur qui endommage directement l'allogreffe et cause sa dysfonction. La réponse inflammatoire est particulièrement très importante lors du rejet d'allogreffes vascularisées, et elle est constituée de trois systèmes proinflammatoires: les chimiokines (Annexe 3), les médiateurs dérivés de l'acide arachidonique (Annexe 4) et le complément.

Défense de l'endothélium par des facteurs de croissance. La perte de fonction est un des cinq signes de l'inflammation, et elle est causée en partie par l'action des facteurs de croissance. Les facteurs de croissance ne sont pas en tant que tel des éléments qui initient l'inflammation, mais plutôt des éléments de réponse secondaires à l'endommagement de l'endothélium par l'attaque des cellules immunitaires lors de la réponse inflammatoire. En effet, afin de rejeter le greffon allogénique, les cellules immunitaires du receveur doivent se rendre dans l'organe. Or, le mécanisme de

recrutement des cellules immunitaires consiste en la contribution variée d'éléments proinflammatoires résultant en une insulte significative de l'endothélium vasculaire via les multiples agressions des médiateurs proinflammatoires et des cellules immunitaires. Suite à l'agression persistante de l'endothélium vasculaire, celui-ci réplique en sécrétant des facteurs de croissance ayant des propriétés immunosuppressives, comme le TGF- β , pour réduire l'intensité de l'attaque immune. En effet, le TGF- β est reconnu comme étant un facteur de croissance produit par les macrophages/monocytes et les cellules endothéliales pour contre-attaquer les effets des cytokines proinflammatoires (Wahl et al., 1988). Ainsi, dans un contexte de transplantation, la fonction du TGF- β est d'inhiber les réponses immunes et inflammatoires puisqu'il inhibe la prolifération et la différenciation des lymphocytes T, et l'activation des macrophages et des cellules endothéliales (Frater-Schroder et al., 1986). Cette cytokine est d'ailleurs primordiale dans le maintien de l'homéostasie du système immunitaire. En effet, il a été démontré que le TGF- β joue un rôle immunorégulateur important dans les maladies autoimmunes impliquant les lymphocytes T autoréactifs (Widder et al., 1991). Cependant, le TGF- β cause également la synthèse des protéines et des récepteurs des protéines de la matrice extracellulaire (par exemple, le collagène, la fibronectine et le VLA-4), des métalloprotéases, et des protéoglycans, favorisant ainsi un remodelage vasculaire (Roberts et al., 1987; Chen et al., 1987). En outre, lorsque l'endothélium vasculaire est endommagé, et sous l'influence des facteurs de coagulation activés, il se produit une agrégation plaquettaire suivi d'une sécrétion du PDGF des plaquettes (Moore, 1981). Le PDGF est un facteur de croissance qui stimule la prolifération de fibroblastes et la synthèse de collagène, favorisant ainsi la fibrose interstitielle (Ross et al., 1982). De plus, il a été rapporté que, suite à une insulte endothéliale, la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses au site inflammatoire peuvent être secondaires à la libération d'autres facteurs de croissance (Moore, 1981; Krishnaswamy et al., 1999). Lors d'une situation physiologique normale, ces facteurs de croissance sont maintenus à des concentrations minimales. Par contre, lors de situations pathologiques, ces facteurs de croissance sont sécrétés en très grande quantité par les cellules

endothéliales, les macrophages et les cellules épithéliales. Suite à une attaque inflammatoire, telle qu'observée durant le rejet d'allogreffe, l'endothélium est endommagé, voire même dénudé. Il y a alors une surproduction des facteurs de croissance par l'endothélium et la média vasculaire afin de conserver les cellules endothéliales endommagées et/ou réparer et remplacer les tissus endommagés par le mécanisme de remodelage (cicatrisation) (Gillman, 1968). Notamment, ces facteurs de croissance possèdent des propriétés angiogéniques qui peuvent amplifier la sévérité de la réponse immunitaire, en permettant aux cellules et médiateurs de l'inflammation de se répandre davantage. De plus, certains facteurs de croissance peuvent augmenter la perméabilité vasculaire et exercer un chimiotactisme sur les monocytes, amplifiant encore davantage la réponse inflammatoire.

Réaction d'hypersensibilité de type retardé. La réponse inflammatoire observée lors du rejet aigu est sensiblement similaire aux réactions classiques d'hypersensibilité de type retardé (Hoy et al., 1969). En effet, les auteurs ont observé une réaction d'hypersensibilité de type retardé chez la souris suite à une greffe de peau allogénique. L'initiation d'une réponse d'hypersensibilité de type retardé consiste en l'interaction des lymphocytes T (en général, les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺) avec l'antigène. Les caractéristiques de la réponse d'hypersensibilité de type retardé ont été définies en observant la cinétique de l'inflammation suite à une injection d'un antigène dans la peau (Hoy et al., 1969). Contrairement aux réponses allergiques qui se manifestent durant les minutes qui suivent l'injection de l'antigène, les réponses d'hypersensibilité de type retardé se manifestent deux ou trois jours suivant l'injection de l'antigène. Ces réactions sont caractérisées par un œdème et une altération de la perméabilité vasculaire, ainsi qu'une infiltration significative, dépendante ou non de l'antigène, des lymphocytes T et B, et des macrophages (van der Kwast et al., 1978). De plus, les réactions d'hypersensibilité de type retardé impliquent la participation de diverses cytokines proinflammatoires, comme l'IL-1, l'IFN- γ et le TNF- α . Les réponses inflammatoires observées dans le rejet aigu d'allogreffe sont complexes et l'importance

de chaque mécanisme régulant les réponses immunitaires n'a pas encore été bien définie. Cependant, il est de toute évidence que les réactions d'hypersensibilité de type retardé contribuent à la pathogenèse du rejet d'organe (Gurley et al., 1983). Le résultat de ces réactions est l'accumulation d'une population mixte de cellules proinflammatoires au site de l'allogreffe. La nature de ce processus inflammatoire est majoritairement non-spécifique, et ne comporte qu'un faible pourcentage de lymphocytes T infiltrants spécifiques contre l'alloantigène. Ainsi, la combinaison des puissants mécanismes non-spécifiques au niveau du greffon contribue étroitement au développement des dommages de l'allogreffe. Il a d'ailleurs été rapporté que les mécanismes de réactions d'hypersensibilité de type retardé sont responsables du rejet aigu tardif chez des patients transplantés rénaux (Ode-Hakim et al., 1996). Il est à noter que les mécanismes de rejet aigu d'allogreffe peuvent être associés à d'autres types de réponses immunes tels les maladies autoimmunes (par exemple, l'arthrite rhumatoïde, l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale le diabète mellitus insulino-dépendant), les tumeurs et les réactions du greffon contre l'hôte (habituellement observé avec des transplantations où l'organe est très immunogène, par exemple l'intestin grêle). Il est d'ailleurs habituel de voir qu'un agent immunosuppresseur utilisé contre ces désordres immuns est également utilisé dans le traitement du rejet aigu d'allogreffe, et vice-versa.

Facteurs indépendants de l'alloantigène

Bien que l'élément déclencheur du mécanisme de rejet aigu soit dépendant de l'alloantigène, il existe des facteurs non-immunologiques, voire indépendants de l'alloantigène, qui participent au développement, au maintien et à l'intensité de la réponse du rejet aigu. Les lésions de l'ischémie/reperfusion, le statut du donneur et la présence d'infection au cytomégalovirus contribuent tous au développement du rejet aigu.

Ischémie/reperfusion. L'ischémie/reperfusion est un processus inévitable en transplantation d'organes et demeure un facteur important qui détermine la survie du

greffon puisque les dommages causés au greffon par ce processus en sont irréversibles. Les lésions de l'ischémie/reperfusion sont associées à une augmentation des risques de rejet aigu, de fonction retardée ou de dysfonctionnement chronique du greffon. Ces dernières sont globalement responsables de plus de 20% de la perte des greffons (Cursio, 2001). De plus, il a été rapporté que l'ischémie/reperfusion est un important facteur de risque indépendant de l'alloantigène, contribuant au rejet chronique (Waaga et al., 2000). Les dommages de l'ischémie/reperfusion sont initiés dès lors du recueil de l'allogreffe, et se poursuivent durant la préservation et la transplantation. En effet, les auteurs ont démontré que les allogreffes rénales exposées à une ischémie/reperfusion et représentant des lésions irréversibles développent une plus grande incidence de syndrome de fonction retardée ou de dysfonctionnement chronique du greffon, et de rejet aigu et chronique. Durant l'ischémie, il y a une déplétion en ATP et une diminution du transport ionique transmembranaire dépendant de l'ATP, causant ainsi une augmentation des fluides intracellulaires, voire un oedème tissulaire (Vial et al., 1982). L'accumulation d'électrolytes lors de la reperfusion et la présence d'oedème tissulaire contribuent à l'obstruction des capillaires, l'augmentation de la viscosité sanguine et la diminution du flot sanguin. Plusieurs médiateurs inflammatoires sont alors produits, notamment les radicaux libres et l'oxyde nitrique (Younes et al., 1984). De plus, l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion (par exemple, les sélectines) sur l'endothélium vasculaire endommagé permet aux leucocytes de s'y adhérer, d'infiltrer le greffon et d'initier la réponse inflammatoire (Suzuki et al., 1989). Également, la régulation à la hausse de l'expression des molécules MHC augmente davantage l'immunogénicité du greffon (Shackleton et al., 1990). Il y a alors une augmentation dans la production des cytokines, chimiokines et molécules d'adhésion, et les monocytes/macrophages et lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ envahissent davantage le greffon. Depuis les dernières années, les chercheurs et cliniciens accordent plus d'importance au phénomène d'ischémie/reperfusion et à l'impact des lésions induites sur la survie du greffon. Plusieurs nouvelles molécules ont été démontrées à prévenir contre les dommages causés par l'ischémie/reperfusion, et elles sont

présentement en intense investigation dans la prévention contre le rejet aigu et chronique. Parmi ces agents prometteurs, on retrouve l'hème-oxygénase, un agent anti-oxydant qui réduit l'apoptose des cellules du greffon, des inhibiteurs de métalloprotéases (par exemple, la MMP-2), la L-arginine, le FTY720 et des inhibiteurs de molécules d'adhésion (par exemple, le rPSGL-Ig) (Katori et al., 2002 ; Wang et al., 2002; Kosaka et al., 2003; Anselmo et al., 2002; Fuller et al., 2001). Le temps de préservation du greffon lors de la période d'ischémie semble également jouer un rôle indirect dans le développement du rejet aigu. Il a été démontré dans un modèle de transplantation rénale chez le lapin, qu'une période d'ischémie froide de moins de 24 heures préserve la fonction mitochondriale des cellules du greffon, tandis qu'une durée d'ischémie supérieure à 48 heures occasionne des lésions irréversibles et l'apoptose des cellules tubulaires causées par une production significative de radicaux libres (Sammut et al., 2000).

Statut du donneur. Beaucoup de données rapportent que les organes provenant de donneurs cadavériques en mort cérébrale expriment un plus grand nombre de médiateurs inflammatoires, causant ainsi une réponse immune plus intense et plus rapide chez le receveur, comparativement aux organes de donneurs vivants (Segel et al., 2002; Pratschke et al., 2001a; 2001b; Wilhelm et al., 2000). En outre, bien qu'il n'y ait pas de lien direct avec le développement du rejet aigu, l'âge du donneur représente un facteur déterminant à la survie des allogreffes, voire à leur capacité de récupération suite à l'insulte ischémique lors de la transplantation d'organes. Il a aussi été rapporté en transplantation rénale que le nombre de néphrons du rein du donneur est un facteur important dans la survie de l'allogreffe chez le receveur. De plus, les différences raciales peuvent influencer la survie de l'allogreffe. Par exemple, comparativement aux Caucasiens, les Africains ont habituellement une plus grande difficulté à tolérer leur allogreffe (Cosio et al., 1996). Il semble que l'hypertension systémique en soit la cause (Cosio et al., 1995). Enfin, il a été rapporté que la masse corporelle du donneur est un facteur influençant la survie de l'allogreffe rénale (Meier-Kriesche et al., 1999).

Infection au cytomégalovirus. Il a été suggéré que l'infection au cytomégalovirus soit un facteur de risque au rejet d'organe (Lautenschlager et al., 1997; Martelius et al., 1997). Les auteurs partagent l'idée que la réponse inflammatoire requise pour initier le rejet aigu et chronique est amplifiée par une réponse immune contre le cytomégalovirus et une augmentation de l'activité des lymphocytes dans la réponse allogénique. En effet, tel que mentionné dans la partie introductrice de l'immunobiologie du rejet aigu, il peut se produire un phénomène de « *cross-priming* » où les lymphocytes T alloréactifs dirigés contre le cytomégalovirus peuvent effectuer une réaction croisée avec les molécules MHC de l'allogreffe. Entre autre, il a été rapporté qu'une infection au cytomégalovirus induit une augmentation de l'expression de la molécule d'adhésion VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales et des molécules MHC à la surface des lymphocytes T, voire une augmentation de la libération des cytokines proinflammatoires telles le $\text{TNF-}\alpha$ et l' $\text{IFN-}\gamma$ (Sedmak et al., 1994; Waldman et al., 1995). L'infection au cytomégalovirus via les médiateurs inflammatoires peut donc aggraver, voire même favoriser le développement du rejet aigu et l'initiation du rejet chronique.

Rejet chronique d'allogreffe: un préjudice complémentaire

Dans le contexte de transplantation d'organes vascularisés, une cause importante dans la perte de l'allogreffe demeure le rejet chronique d'allogreffe, aussi appelé « dysfonction chronique de l'allogreffe » ou « athérosclérose d'allogreffe », puisque les caractéristiques sont très similaires à l'athérosclérose lipidique. Le rejet chronique représente l'obstacle majeur à la survie à long terme des allogreffes en transplantation clinique. En général, le rejet chronique apparaît de 4-12 mois après la transplantation et il se développe pendant plusieurs années avant que l'allogreffe ne devienne complètement défaillant. Ce phénomène pathologique est caractérisé par la persistance d'une inflammation de faible intensité dans la périphérie vasculaire et sous-endothéliale provoquant un épaissement de la néo-intima, un rétrécissement de la lumière

vasculaire et une occlusion des artères et des artérioles qui irriguent l'allogreffe, qui sont secondaires à une prolifération soutenue des cellules musculaires lisses dans l'intima (Häyry et al., 1997). Dans ce contexte, l'apport en oxygène et en nutriments à l'allogreffe via le sang est considérablement diminué, l'allogreffe entre alors en phase d'insuffisance, et elle devient éventuellement dysfonctionnelle. Suite à une transplantation allogénique, tous les organes solides et vascularisés sont sujets au rejet chronique. Chaque type d'organe possède ses altérations spécifiques du rejet chronique, mais cette caractéristique histologique semble être commune à toutes les allogreffes en épisode de rejet chronique. Or, on peut ainsi qualifier le rejet chronique comme étant une athérosclérose d'allogreffe qui, avec le temps, cause la dysfonction chronique de l'organe.

Facteurs de risques du rejet chronique. Le rejet chronique d'allogreffe est un processus complexe et multifactoriel. Il est bien connu qu'il existe plusieurs facteurs prédisposant au rejet chronique. Ces causes sont classifiées comme étant des facteurs dépendant de l'antigène, des facteurs indépendant de l'antigène ou des facteurs infectieux (Häyry, 1998). i) Facteurs dépendant de l'antigène. Les épisodes répétitifs de rejet aigu, une immunosuppression insuffisante, l'histoincompatibilité, la présence d'anticorps anti-HLA et l'absence d'anticorps antiidiotypiques chez le receveur demeurent les causes typiques de cette classe. ii) Facteurs indépendant de l'antigène. Les principaux facteurs qui ne dépendent pas de la présence d'antigène sont l'âge du donneur (juvénile ou âgé), l'état de santé du donneur et de l'organe, les dommages causés par l'ischémie/reperfusion, l'hyperlipidémie, la néphrotoxicité induite par les immunosuppresseurs et l'incompatibilité de la taille du greffon entre le donneur et le receveur. iii) Facteurs infectieux. Il existe notamment une troisième classe de facteurs de risque au rejet chronique, notamment la présence d'infection. En effet, l'infection au cytomégalo virus représente le facteur infectieux le plus important associé au rejet chronique. Cependant, plusieurs évidences démontrent que certains facteurs infectieux et indépendants de l'antigène peuvent contribuer au rejet chronique via le rejet aigu

(Häyry, 1998). Or, il semble que le rejet aigu soit le facteur de risque le plus important au rejet chronique. Comme la réponse inflammatoire joue un rôle capital dans le rejet aigu, cela nous laisse croire que l'inflammation contribue sans doute au processus complexe et multifactoriel du rejet chronique.

L'inflammation et le rejet chronique. De manière incontestable, la réponse inflammatoire et le rejet chronique vont de pair. Plusieurs évidences démontrent la participation et la présence des principaux éléments de l'inflammation dans la pathogenèse du rejet chronique. i) Rôle des molécules d'adhésion. Les molécules d'adhésion et leurs ligands jouent un rôle significatif dans la réponse inflammatoire lors du recrutement des leucocytes. Or, des études suggèrent l'importance des molécules d'adhésion dans le rejet chronique (von Willebrand et al., 1997; Koskinen et al., 1997; Kauppinen et al. 2000; Korom et al., 1998; Steeber et al., 1999; Viklicky et al., 2001; Kurkijarvi et al., 2001). Koskinen et al. (1997) ont démontré que l'intensité de l'épaississement néo-intimale artérielle est en étroite corrélation avec l'expression de VCAM-1 et de la P-sélectine, dans des modèles d'athérosclérose d'allogreffe cardiaque chez le rat. Or, les auteurs suggèrent que VCAM-1 et la P-sélectine pourraient avoir un rôle déterminant dans le développement du rejet chronique. Une étude menée par Kauppinen et al. (2000) rapporte également l'importance de l'interaction des molécules d'adhésion ICAM-1/LFA-1 et VCAM-1/VLA-4 dans le rejet chronique. Cependant, les auteurs démontrent que l'expression de VCAM-1 est induite seulement au début de la réponse inflammatoire et que celle-ci disparaît dans la période tardive du rejet chronique. Il semble alors qu'une fois initié par le processus inflammatoire, le rejet chronique progresse lentement durant des mois et des années avant de développer les dysfonctions caractéristiques de la maladie. De plus, Korom et al. (1998) ont démontré que l'utilisation de peptides synthétiques de fibronectine empêche l'interaction entre les molécules d'intégrine VLA-4 et la fibronectine, lors de la diapédèse. Les auteurs suggèrent que la synthèse locale de fibronectine pourrait être un facteur déterminant dans la pathogenèse du rejet chronique, puisque les cellules inflammatoires

interagissent directement avec cette protéine de la matrice extracellulaire. Enfin, une intéressante étude suggère que le passage des leucocytes au site de l'inflammation requiert la présence de plusieurs types d'interactions des molécules d'adhésion (Steeber et al., 1999). De plus, les auteurs démontrent que la L-sélectine et ICAM-1 fonctionnent de manière synergique à faciliter les interactions entre les leucocytes et les cellules endothéliales *in vivo*. Viklicky et al. (2001) ont rapporté que des patients transplantés rénaux atteints de rejet chronique possèdent un niveau plasmatique élevé de P-sélectine soluble. Kurkijarvi et al. (2001) ont également rapporté que la molécule d'adhésion VAP-1 (*vascular adhesion protein-1*) joue un rôle dans le rejet chronique en favorisant les interactions entre les lymphocytes et les cellules endothéliales. ii) Rôle des cytokines et des chimiokines proinflammatoires. Il est connu que les cytokines et chimiokines jouent un rôle important dans le rejet chronique (Marra, 2002; DeVries et al., 2003). Une étude clinique effectuée par une équipe Norvégienne rapporte que les concentrations sanguines d'IL-6 et de MCP-1 sont significativement plus élevées chez des patients transplantés cardiaques atteints d'athérosclérose d'allogreffe que chez des patients transplantés cardiaques sans signe de rejet chronique (Gullestad et al., 1999). Les auteurs affirment que dès l'initiation du rejet chronique, celui-ci progresse indépendamment du rejet aigu puisque aucun des patients n'a démontré d'incidence de rejet aigu lors d'analyse sanguine. D'autres études ont également rapporté la présence de MCP-1 dans des artères de patients atteints d'athérosclérose (Samson et al., 1999). De plus, Elssner et al. (2000) ont démontré que des patients atteints du syndrome *bronchiolitis obliterans*, une forme de rejet chronique spécifique à la transplantation pulmonaire et caractérisée par la présence d'inflammation alvéolaire et de fibrose, possèdent des taux élevés d'IL-8 et de TGF- β dans les fluides bronchoalvéolaires, comparativement à des patients transplantés pulmonaires normaux. En outre, Corsi et al. (1999) ont rapporté chez des patients transplantés rénaux en incidence de rejet chronique, la présence élevée de taux plasmatiques de la chimiokine RANTES. Enfin, une élégante étude démontre l'importance du récepteur de chimiokine CCR1 dans le développement du rejet chronique (Gao et al., 2000). Dans un modèle de transplantation

cardiaque allogénique utilisant des souris *knock-out* CCR1 homozygotes comme receveurs, les auteurs ont démontré que ces souris CCR1^{-/-} ne présentaient aucun signe de rejet chronique même après 200 jours de transplantation, contrairement aux receveurs CCR1^{+/+} dont le rejet chronique était installé. Il semble alors que les interactions CCR1/ligand sont très importantes dans le rejet chronique. D'autres cytokines semblent être impliquées dans la pathogenèse du rejet chronique. Entre autre, le TNF- α , à fortes concentrations, peut causer une thrombose intravasculaire due à la perte des propriétés anticoagulantes de l'endothélium, un phénomène observé lors du rejet chronique. L'IFN- γ est aussi un bon participant dans le rejet chronique puisqu'il est un puissant activateur des cellules endothéliales vasculaires et qu'il amplifie l'action de TNF- α sur l'endothélium à promouvoir l'adhésion et l'extravasation des lymphocytes aux sites de l'inflammation. Récemment, Streblow et al. (2003) ont démontré une corrélation entre l'accélération du rejet chronique et l'expression à la hausse de chimiokines induite par le cytomégalo virus. iii) Rôle du complément. Le système du complément joue un rôle dans la réponse inflammatoire en libérant ses sous-produits, les anaphylatoxines, qui vont causer la dégranulation de plusieurs cellules et la libération d'autres médiateurs tels l'histamine. Le complément joue certes un rôle non-négligeable dans le rejet chronique. De plus, il est bien connu que la réponse humorale joue un rôle primordial dans ce type de rejet puisqu'on retrouve dans les tissus chroniquement rejetés une forte présence d'IgG, d'IgM, des dépôts de C3 (sous-produits du complément) et des macrophages infiltrants. Une expérience menée par Russell et al. (Coffman, 1997) rapporte que des traitements répétés de sérum de souris immunisées à des souris SCID (qui ne possèdent pas de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺) causent des lésions vasculaires chroniques dans des allogreffes cardiaques. La présence d'anticorps, du complément et des macrophages infiltrants ont été identifiés dans ces lésions. Les résultats suggèrent que le rejet chronique peut se développer sans la présence de lymphocytes T, et que l'immunité humorale y est fortement impliquée. En outre, Kallio et al. (2000) ont démontré que l'inhibition du système du complément par les voies classique et alternative via un traitement soluble au sCR1, un régulateur du

complément de type 1, empêche le développement du syndrome *bronchiolitis obliterans* dans un modèle d'allogreffe trachéale chez le rat. De plus, les rats traités au sCR1 présentaient une plus faible expression des molécules IL-8 et ICAM-1, et une plus faible infiltration de neutrophiles comparativement aux rats témoins. Récemment, Qian et al. (2001) ont démontré que les sous-produits terminaux du complément C5b-C9, formant le complexe MAC, jouent un rôle dans la pathogenèse de l'athérosclérose accélérée d'allogreffe.

iv) Rôle des éicosanoïdes. Les prostaglandines, la thromboxane A₂, les leukotriènes et PAF (facteur d'activation des plaquettes) sont tous impliqués dans la réponse inflammatoire et, théoriquement, peuvent contribuer à la progression du rejet chronique. Les éicosanoïdes induisent notamment la vasodilatation (par exemple, PGD₂ et PAF) et la perméabilité vasculaire (par exemple, les pseudoleukotriènes), et ils possèdent aussi une activité chimiotactique (par exemple, PGD₂), favorisant ainsi l'expansion des cellules inflammatoires et d'autres médiateurs au site de l'inflammation. En outre, les éicosanoïdes peuvent aussi stimuler l'agrégation plaquettaire (par exemple, la thromboxane A₂) et induire la libération de PDGF, causant ainsi la synthèse de fibrose, caractérisée par une prolifération des fibroblastes et de la synthèse de collagène. De plus, ils peuvent induire l'expression des molécules MHC et d'intégrines, et donc favoriser l'adhésion leucocytaire et la production d'IL-1 et d'IFN- γ , des cytokines proinflammatoires impliquées dans le rejet aigu et le rejet chronique (Coffman, 1997). Il a été rapporté que l'utilisation concomitante d'un inhibiteur de la thromboxane A₂ synthétase (OKY-046) et d'un analogue de la prostaglandine 12 (OP-2507) inhibe fortement l'athérosclérose dans un modèle de transplantation aortique allogénique chez le rat (Hirano et al., 2001). Cependant, il y a peu d'évidences cliniques démontrant que les éicosanoïdes sont directement impliqués dans le rejet chronique.

v) Rôle des facteurs de coagulation. Le processus de coagulation peut également favoriser le développement du rejet chronique. Plusieurs facteurs de coagulation comme PAF, la thromboxane A₂ et le facteur de von Willebrand induisent l'agrégation plaquettaire, voire la coagulation. Or, lorsque les plaquettes sont activées, elles libèrent le PDGF. Le PDGF est un facteur de croissance qui cause la prolifération des fibroblastes et la

synthèse du collagène, et donc le développement de la fibrose tissulaire et interstitielle. En effet, une étude démontre que les dépôts glomérulaires des allogreffes rénales chroniquement rejetées contiennent une grande quantité de facteur de von Willebrand, tandis que ce facteur n'est pas détecté dans les allogreffes en épisode de rejet aigu ou les reins normaux (Lagoo et al., 2000). Une récente étude démontre que l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1 (PAI-1) est impliqué dans le rejet chronique chez des patients transplantés rénaux avec une allogreffe d'une moyenne de 7.35 ans (Lahlou et al., 2002).

vi) Rôle des facteurs de croissance. Plusieurs études rapportent l'importance des facteurs de croissance dans le développement du rejet chronique (Jain et al., 2000 ; Little et al., 1999; Kerby et al., 1997; Pilmore et al., 1999; Lee et al., 1997). Entre autre, une étude démontre dans un modèle de transplantation aortique infrarénale chez le rat que les taux plasmatiques et l'expression génique de TGF- β sont significativement élevés au début du rejet chronique. De plus, les auteurs rapportent qu'il existe une corrélation entre les concentrations plasmatiques de TGF- β et la prolifération de la néo-intima aortique dans la période précoce de la maladie. Il semble alors que le TGF- β est un facteur déterminant dans l'initiation du rejet chronique (Little et al., 1999). Jain et al. (2000) rapportent également l'importance de TGF- β dans la néphropathie chronique d'allogreffe rénale. Dans une étude rétrospective, il a été rapporté par Kerby et al. (1997) que des patients transplantés rénaux atteints de rejet chronique exprimaient de manière importante la protéine et l'ARNm de l'aFGF dans l'interstitium tubulaire, comparativement à des patients transplantés rénaux dont l'allogreffe ne présentait aucun signe de rejet chronique, et dont l'expression d'aFGF demeure faiblement exprimée. De plus, les tissus chroniquement rejetés exprimaient une très forte concentration de récepteurs de l'aFGF ainsi que la présence d'infiltrat inflammatoire (par exemple, des macrophages et des cytokines proinflammatoires) et de microvasculature (effet angiogénique). Une autre étude effectuée sur des patients transplantés rénaux démontre que les patients en rejet chronique exprimaient de façon importante la protéine VEGF dans le compartiment interstitiel comparativement aux patients transplantés témoins. Sur les coupes histologiques des tissus chroniquement

rejetés, en plus de la présence de VEGF, une forte concentration de macrophages infiltrants a également été démontrée. Enfin, dans une étude menée par Lee et al. (1997), les auteurs ont démontré dans un modèle de rejet chronique pulmonaire chez le rat que les lésions pulmonaires chroniquement rejetées exprimaient une forte concentration de bFGF, d'IL-8 et d'IL-1. L'IL-8 et bFGF sont tous les deux fortement exprimés au début du rejet chronique. Tout comme les auteurs d'autres études, Lee et al. (1997) ont identifié la grande présence de macrophages infiltrants ainsi qu'une prolifération de la microvasculature.

vii) Rôle du cytomégalovirus. Il a été suggéré que l'infection au cytomégalovirus soit un facteur de risque au rejet chronique. En effet, deux études (Lautenschlager et al., 1997; Martelius et al., 1997) supportent cette hypothèse. Les auteurs partagent l'idée que la réponse inflammatoire requise pour initier le rejet chronique soit amplifiée par la présence du virus soit par une réponse immune contre le cytomégalovirus et/ou par une augmentation de l'activité des lymphocytes dans la réponse allogénique. Il a aussi été rapporté que le cytomégalovirus induit une augmentation de l'expression de VCAM-1 à la surface de la cellule endothéliale et des molécules MHC voire de la libération de TNF- α et de l'IFN- γ . L'infection au cytomégalovirus via les médiateurs inflammatoires pourrait donc aggraver voire même favoriser l'initiation du rejet chronique. Tout récemment, Streblow et al. (2003) ont démontré que le cytomégalovirus peut induire une augmentation de l'expression de chimiokines, et que celle-ci est directement corrélée avec le temps d'initiation et l'aggravation du rejet chronique.

viii) Rôle de l'ischémie/reperfusion. L'ischémie/reperfusion est un processus inévitable en transplantation d'organe et il demeure un facteur important qui détermine la survie de l'allogreffe puisque les dommages causés par ce processus causent des lésions irréversibles au greffon (Bohmova et al., 2001). Il a été rapporté que l'ischémie/reperfusion est un important facteur de risque indépendant de l'antigène du rejet chronique (Waaga et al., 2000). Les dommages de l'ischémie/reperfusion sont initiés lors de la récupération de l'organe, de la préservation ischémique et durant la transplantation. En effet, il a été démontré que l'ischémie/reperfusion cause un plus grand risque de syndrome primaire non

fonctionnel et de fonction retardée, de rejet aigu et de rejet chronique dans des allogreffes rénaux (Waaga et al., 2000). Durant l'ischémie, il y a une déplétion en ATP et une diminution du transport ionique transmembranaire dépendant de l'ATP, causant une augmentation des fluides intracellulaires, voire un oedème tissulaire. L'accumulation d'électrolytes lors de la reperfusion et la présence d'oedème tissulaire contribuent à l'obstruction des capillaires, l'augmentation de la viscosité sanguine et la diminution du flot sanguin. Plusieurs médiateurs inflammatoires sont alors produits, notamment les radicaux libres. De plus, l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion (par exemple, les sélectines) sur l'endothélium vasculaire endommagé permet aux leucocytes de s'y adhérer, d'infiltrer le greffon et d'initier la réponse inflammatoire. Également, la régulation à la hausse de l'expression des molécules MHC augmente davantage l'immunogénicité du greffon. Il y a alors une augmentation dans la production de cytokines, chimiokines et molécules d'adhésion, et les monocytes/macrophages et lymphocytes T CD4⁺ envahissent davantage l'allogreffe. Dans un même ordre d'idées, beaucoup de données rapportent que les organes provenant de donneurs cadavériques en mort cérébrale expriment un plus grand nombre de médiateurs inflammatoires, causant ainsi une réponse immune plus intense et plus rapide chez le receveur, comparativement aux organes de donneurs vivants. Cependant, une étude démontre que le paramètre d'ischémie/reperfusion seul n'engendre pas d'augmentation de molécules d'adhésion, ne causent pas de réactions inflammatoires significatives, ni ne permet au rejet chronique de s'installer, dans un modèle d'autotransplantation rénale chez le rat (Kauppinen et al., 2000). Dans une récente étude, Herrero-Fresneda et al. (2003) rapportent que des épisodes prolongés d'ischémie froide favorisent l'initiation de la néphropathie chronique d'allogreffe chez des greffons dont l'alloréactivité est élevée. Il semble alors que d'autres facteurs dépendant de l'antigène seraient importants dans le rejet chronique. Ce qu'il faut tirer de ces expériences, c'est que la réponse inflammatoire joue un grand rôle dans l'initiation du rejet chronique. Cette inflammation (qui est en quelque sorte le rejet aigu) est la réponse de l'organisme receveur contre l'intrus, c'est-à-dire l'allogreffe (réponse

dépendante de l'antigène). Plusieurs auteurs ont d'ailleurs rapporté l'hypothèse que des épisodes répétitifs de rejet aigu favorisent le développement du rejet chronique. Lorsqu'il y a reconnaissance allogénique, toute la 'machine de guerre' se met en branle pour se débarrasser de l'intrus. Si les traitements immunosuppresseurs sont insuffisants pour contrôler le système immunitaire du receveur, celui-ci risque de rejeter son greffon. Or, dans ce contexte, le rejet aigu est en quelque sorte synonyme d'inflammation. Les cellules et les médiateurs proinflammatoires envahissent l'allogreffe et favorisent l'attaque de l'immunité cellulaire et humorale. Durant un épisode de rejet aigu, le patient transplanté reçoit une dose supplémentaire d'immunosuppresseurs pour calmer son système immunitaire. Par contre, à chaque fois qu'il se produit un épisode de rejet aigu ou d'une attaque inflammatoire, des tissus deviennent endommagés, plus particulièrement l'endothélium vasculaire puisque les vaisseaux sanguins et capillaires sont les routes qui mènent les cellules et les médiateurs proinflammatoires à l'allogreffe. Lorsque l'endothélium est endommagé, il sécrète des facteurs de croissance qui ont tous la propriété de réparer ou de remplacer les tissus endommagés. Les facteurs comme aFGF, bFGF, TGF- β et PDGF sont responsables de la production des composantes qui forment le tissu cicatriciel (fibrose, collagène, etc.). Par exemple, une allogreffe rénale en rejet chronique avancé comporte énormément de fibroses interstitielles, tandis que la fibrose est moins apparente dans un organe en début de rejet chronique, ou bien elle est absente dans un organe sain. La formation de fibrose entrave considérablement le fonctionnement d'un organe puisque le tissu cicatriciel ne possède ni la souplesse ni l'élasticité des tissus normaux et ne peut donc pas accomplir les fonctions du tissu qu'il remplace. À mesure que l'endothélium est endommagé, il initie sa propre réparation via les facteurs de croissance et les cellules musculaires lisses et fibroblastes. Une formation de fibrose interstitielle et la prolifération de la néo-intima se produisent. Dans un vaisseau sanguin, à mesure que la néo-intima prolifère, la lumière vasculaire se rétrécit et une occlusion des artères et des artérioles se produit. Tous ces processus répétitifs de réparation tissulaire jouent un rôle dans la défaillance de l'allogreffe et ils peuvent prendre des mois voire même des

années avant que l'allogreffe tombe en défaillance totale. Bref, une vision globale nous permet de comprendre que le rejet chronique est la conséquence ultime d'une kyrielle d'agressions immunes et inflammatoires, amplifiées par plusieurs facteurs, additionnées dans le temps.

FIGURE 1.3.1. Activation du lymphocyte T

CELLULE PRÉSENTATRICE D'ANTIGÈNE

LYMPHOCYTE T

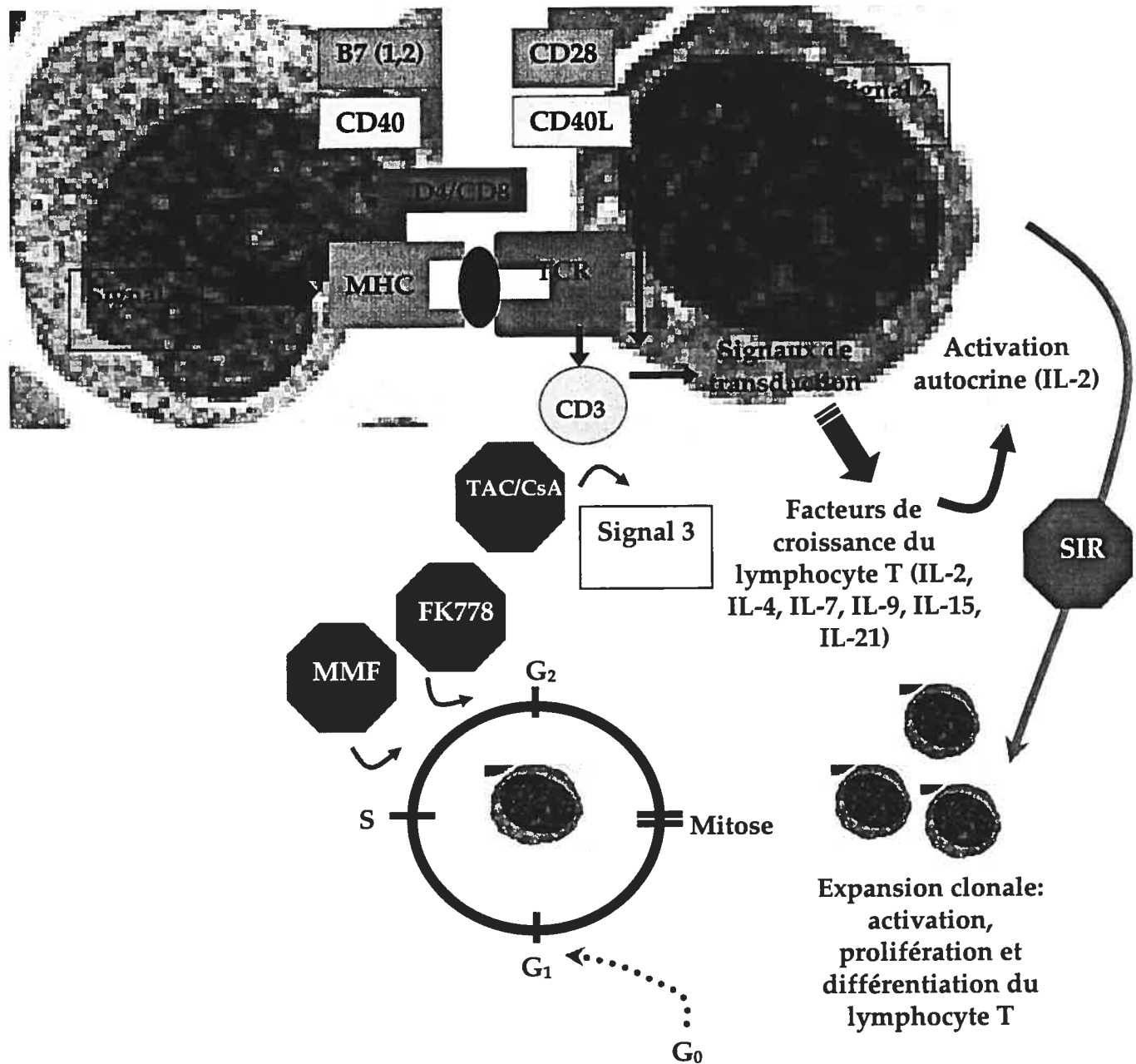
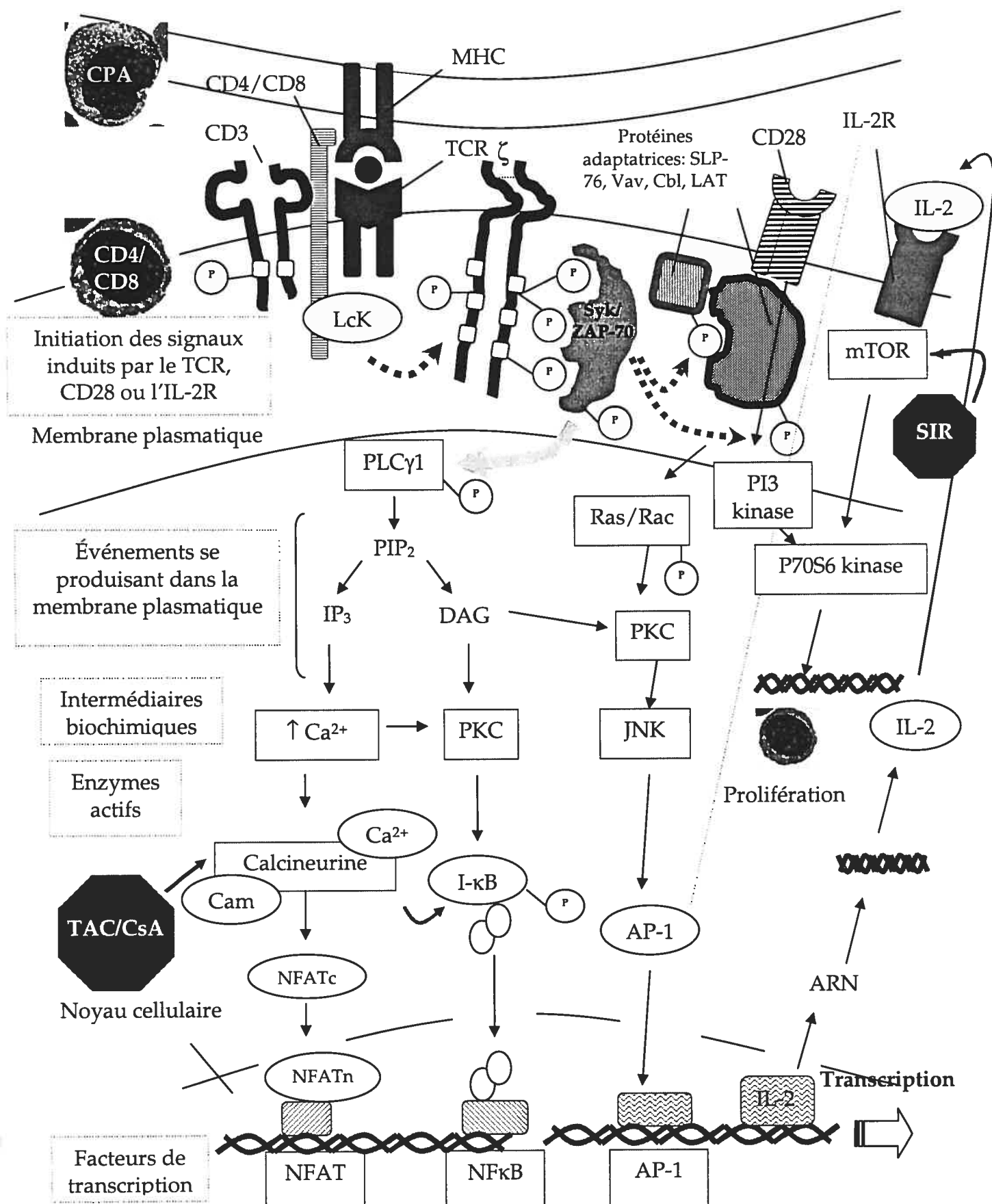
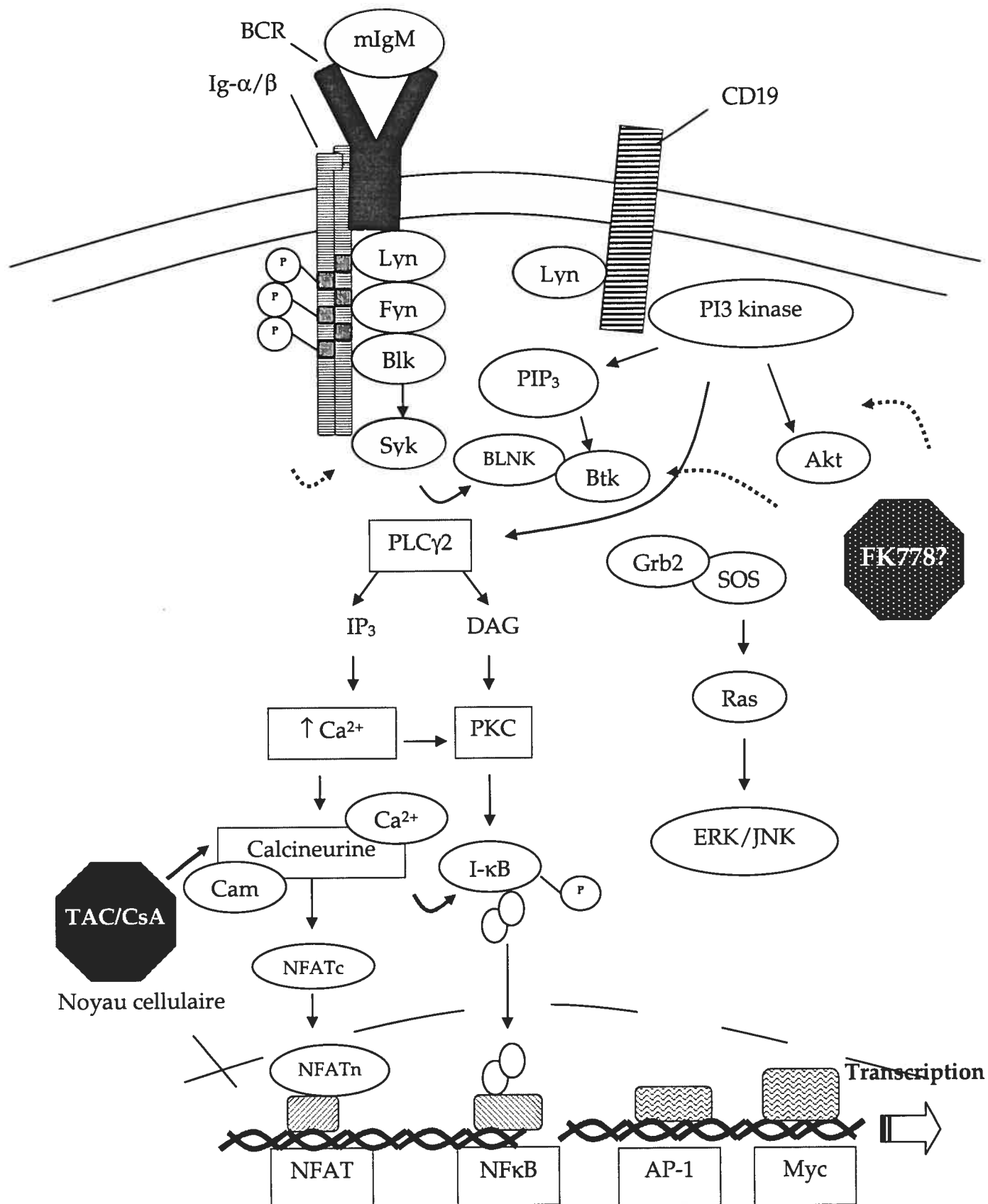


FIGURE 1.3.2. Signalisation intracellulaire du lymphocyte T



Adapté et modifié de Abbas et al., 2000; Suthanthiran et al., 1996.

FIGURE 1.3.3. Signalisation intracellulaire du lymphocyte B



Adapté et modifié de Gauld et al., 2002; Kurosaki, 1999.

FIGURE 1.3.4. Recrutement des leucocytes dans l'allogreffe

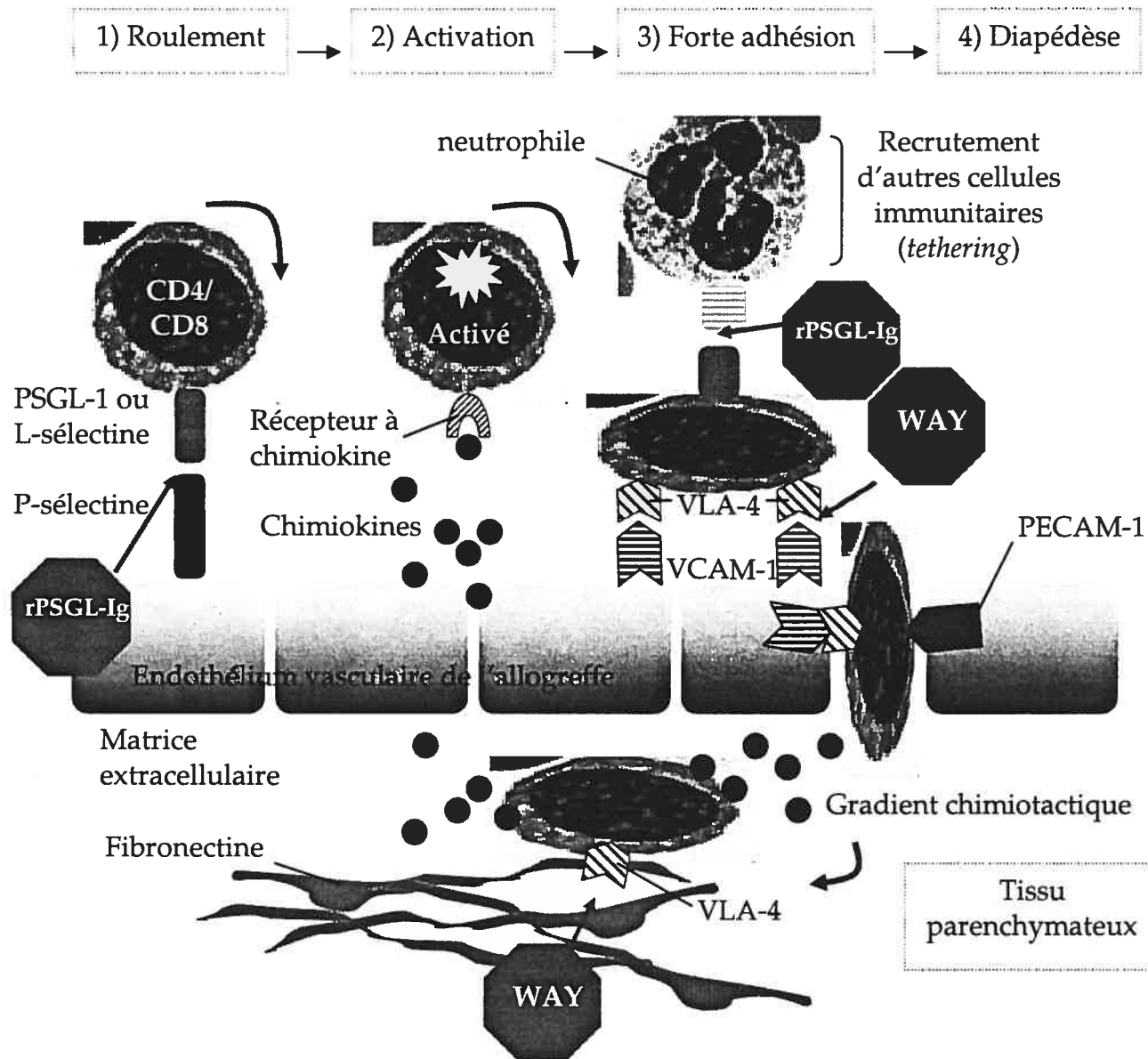


TABLEAU 1.3.1. Cytokines et chimiokines impliquées dans le rejet d'allogreffe

Cytokines/ chimiokines	Actions biologiques
IL-1 $\alpha\beta$	Activation des lymphocytes T et B, prolifération des fibroblastes, cause la fièvre.
IL-2	Induction de la croissance cellulaire et la différenciation des lymphocytes T et B, et des cellules NK.
IL-4	Facteur de croissance des lymphocytes T et B.
IL-5	Induction de la croissance cellulaire et la différenciation des éosinophiles, prolifération des lymphocytes B.
IL-6	Différenciation des lymphocytes B.
IL-7	Développement des lymphocytes T dans le thymus.
IL-8	Chimiotactisme envers les neutrophiles.
IL-9	Stimulation des lymphocytes T, facteur de croissance pour les mastocytes.
IL-10	Inhibition de la présentation antigénique et production d'interféron- γ .
IL-12	Potentialisation de la production de l'interféron- γ .
IL-13	Inhibition de la production de l'IL-1, du TNF, de l'IL-6, et de l'IL-8, induction de la production de l'IFN- γ .
IL-15	Facteur de croissance essentiel à l'initiation de la division cellulaire du lymphocyte T.
IL-21	Stimulation de l'activité cytolytique des lymphocytes T CD8 ⁺ et des cellules NK, régulation de l'immunité innée à l'immunité adaptative, inhibition de la production d'IFN- γ par les cellules de type Th1.
TNF- $\alpha\beta$	Inhibition de la prolifération des lymphocytes T et B et de l'activation des macrophages, stimulation des facteurs de croissance des fibroblastes.
IFN- γ	Activation des macrophages, induction de l'expression des molécules MHC de classe I et II.
TGF- β	Inhibition de la prolifération des lymphocytes T et B, inhibition de l'activation des macrophages, stimulation des facteurs de croissance des fibroblastes.
RANTES	Chimiotactisme et activation des monocytes et lymphocytes (effet tardif).
MIP-1 $\alpha\beta$	Chimiotactisme et activation des monocytes et lymphocytes (effet précoce).

Modifié et reproduit de Krensky, 2001.

1.4 PRÉVENTION ET TRAITEMENT DU REJET D'ALLOGREFFE

Afin de conserver le bon fonctionnement de l'allogreffe, les cliniciens et scientifiques ont rapidement compris que le patient transplanté doit recevoir un traitement immunosuppresseur approprié, c'est-à-dire que le patient doit être dans un état où sa défense immunitaire est réduite afin que celle-ci ne rejette pas l'allogreffe, mais qu'elle soit assez efficace pour combattre contre les infections opportunistes et les cancers. Il existe deux grandes stratégies pour minimiser l'intensité du rejet aigu d'allogreffe. On peut réduire l'immunogénicité du greffon et traiter le receveur à l'aide de thérapies immunosuppressives physiques ou pharmaceutiques.

Méthodes pour réduire l'immunogénicité de l'allogreffe

En transplantation clinique, la stratégie principale pour réduire le degré d'immunogénicité du greffon est de minimiser les différences allogéniques entre le donneur et le receveur. Il existe quatre tests cliniques pour évaluer ces différences allogéniques: 1) le test sanguin ABO; 2) le test d'histocompatibilité HLA; 3) la détection d'anticorps anti-HLA chez le receveur; et 4) la détection d'anticorps anti-donneur chez le receveur (test du *crossmatch*).

Test sanguin ABO. Afin d'éviter un rejet d'allogreffe de type hyperaigu, qui est causé par les anticorps naturels IgG et IgM dirigés contre les antigènes des groupes sanguins ABO, l'évaluation de la compatibilité du type sanguin du donneur et du receveur est primordiale (Murphy et al., 1969; Alexandre et al., 1991). Il a été rapporté qu'une incompatibilité au niveau des groupes sanguins ABO a un effet catastrophique chez des patients transplantés rénaux et cardiaques (Starzl et al., 1963; Stock et al., 1987; McKenzie et al., 1987). Habituellement, un rejet hyperaigu survient lorsque les patients transplantés ont des titres élevés d'anticorps anti-A et anti-B, en plus d'être des receveurs d'allogreffes de donneurs incompatibles (Reding et al., 1987). Dintenfass et al. (1974) ont d'ailleurs observé qu'une incompatibilité des groupes sanguins ABO

provoque une agrégation des plaquettes sanguines et l'augmentation de la viscosité du sang chez des patients en hémodialyse et des patients transplantés rénaux. Il est aujourd'hui rare en clinique de rencontrer des incidences de rejet hyperaigu lors de transplantation allogénique, se manifestant seulement à quelques minutes après anastomose des vaisseaux sanguins, puisque le test sanguin ABO est disponible et demeure un test de routine voire facilement réalisable. Le test ABO est fondé sur l'existence des anticorps naturels (aussi appelés iso-agglutinines dirigés contre les antigènes A et B présents à la surface des érythrocytes. Découvert par Karl Landsteiner en 1901, le système ABO demeure le plus important système de groupes sanguins. Il est à noter que des transplantations d'organes peuvent se faire même si le donneur et le receveur sont ABO-incompatibles. Dans ce cas, une plasmaphérèse est requise pour réduire les titres d'anticorps anti-A et anti-B chez le receveur. Cependant, il a été rapporté, dans un cas isolé d'un patient transplanté, qu'une hémolyse causée par une incompatibilité mineure des antigènes ABO est possible (Jayaranee et al., 2002). Les auteurs suggèrent qu'un test direct de Coombs (test antiglobuline) doit toujours être effectué lors de transplantations entre donneur et receveur ABO-incompatibles.

Test d'histocompatibilité HLA. La valeur pronostique du test d'histocompatibilité HLA (*HLA typing*) a été démontrée à être très utile en transplantation clinique (Ringden et al., 1975). Tel que mentionné, les molécules HLA sont des cibles importantes dans la réponse contre l'allogreffe. Les protéines codées par les gènes HLA de classe I sont A, B et C, tandis que les gènes HLA de classe II codent pour les protéines DP, DQ et DR. Puisque les molécules HLA sont fortement polymorphiques et que chaque gène HLA possède plusieurs allèles, il existe des millions de combinaisons possibles de molécules HLA. En transplantation rénale avec donneur cadavérique, ce sont les molécules HLA-A, HLA-B et HLA-DR qui sont généralement prises en considération (Albrechtsen et al., 1978). Cependant, même si les molécules HLA-C, HLA-DP et HLA-DQ ne sont normalement pas vérifiées lors de transplantation entre individus sans lien de parenté, elles peuvent être

immunogéniques et représenter des cibles potentielles de la réponse immune contre l'allogreffe. En transplantation cardiaque, il semble que l'impact de la compatibilité entre donneurs et receveurs au niveau des molécules HLA est un facteur plus ou moins important sur la survie des allogreffes (Opelz, 1989). Cependant, la compatibilité au niveau des molécules HLA est d'une importance capitale en transplantation rénale. En effet, il a été rapporté qu'une compatibilité complète au niveau des molécules HLA ou deux haplotypes compatibles entre un donneur et un receveur résulte en une survie d'allogreffe significativement prolongée (Stewart et al., 1969). De manière générale, le rejet aigu d'allogreffe rénale survient plus précocement lorsqu'il y a incompatibilité au niveau des molécules HLA de classe II (HLA-DR) qu'au niveau des molécules HLA de classe I (HLA-A et HLA-B). Ceci souligne davantage l'importance des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires comparativement aux lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques dans le rejet aigu d'allogreffe. Il existe différentes méthodes pour évaluer la compatibilité des molécules HLA, soit par vérification des gènes HLA ou leurs produits de gènes respectifs (Erlich et al., 2001; Norman, 2001a).

- 1) la technique de cytotoxicité dépendante du complément est une méthode sérologique utilisant des anticorps pour détecter les molécules HLA exprimées à la surface des lymphocytes T de classe I (précision de 98%) et de classe II (précision de 85%);
- 2) la technique SSP (*sequence specific priming*) est une méthode utilisant la réaction de polymérase en chaîne pour amplifier les gènes HLA à l'aide d'amorces spécifiques pour différents allèles d'un gène HLA, et dont l'évaluation se fait par électrophorèse (Newton et al., 1989);
- 3) la technique SSOP (*sequence specific oligonucleotide probes*) est une méthode qui utilise également la réaction de polymérase en chaîne pour amplifier les gènes HLA mais qui emploie des sondes de séquences de nucléotides spécifiques pour différents allèles d'un gène HLA, et dont l'évaluation se fait par la détection d'une hybridation de la sonde avec l'ADN (méthode du *Dot blot*, Saiki et al., 1986);
- 4) la dernière technique consiste à déterminer la séquence de nucléotides de l'ADN du gène HLA particulier par séquençage (Santamaria et al., 1992).

Détection d'anticorps anti-HLA chez le receveur. Tel que mentionné ultérieurement, la présence d'anticorps anti-HLA chez le receveur est causée par une exposition aux molécules HLA lors de transfusions sanguines, grossesses ou transplantations antérieures. Ces anticorps anti-HLA sont potentiellement dangereux puisqu'ils réagissent avec les molécules HLA présentes sur l'endothélium des vaisseaux sanguins de l'allogreffe, causant une réaction inflammatoire, une coagulation, voire des dommages ischémiques irréversibles. Il existe plusieurs techniques pour détecter les anticorps anti-HLA chez le receveur. Notamment, on retrouve la méthode conventionnelle PRA (*panel reactive antibody*), un test de cytotoxicité qui évalue la capacité des anticorps à tuer les cellules cibles (par exemple, les cellules mononucléées du sang périphérique ou lymphocytes T et B) via l'activation du complément (McKenzie et al., 1968). Cependant, cette méthode ne discrimine pas les molécules HLA des autres molécules présentes sur les lymphocytes, ni les anticorps IgG des anticorps IgM (Norman, 2001a). De nouvelles méthodes de détection plus précises existent maintenant. Le test ELISA peut détecter la présence des anticorps anti-HLA dans le sérum du receveur, en plus de déterminer si ces anticorps sont dirigés contre les molécules HLA de classe I ou II, de différencier entre les anticorps IgM et IgG, et de définir la spécificité de ces anticorps anti-HLA (Kao et al., 1993). Une autre récente méthode de détection est la cytométrie en flux utilisant des billes avec des molécules HLA adhérentes de classe I ou II (Le Bouteiller et al., 1983). La présence d'anticorps anti-HLA est représentée par une émission de lumière détectée par cytométrie en flux, après incubation des billes avec le sérum du receveur et un anticorps anti-humain conjugué à un fluorochrome. Une nouvelle méthode de cytométrie en flux qui ne requiert pas l'utilisation de cellules et qui permet la détection d'anticorps spécifiques contre l'alloantigène induits par l'activation du complément a été récemment rapportée (Wahrman et al., 2003).

Détection d'anticorps anti-donneur chez le receveur (test du *crossmatch*). La détection d'anticorps anti-donneur dans le sérum d'un receveur potentiel est l'ultime

test clinique effectué avant qu'un organe soit attribué à un patient pour une transplantation (Norman, 2001a). Le test du *crossmatch* permet d'éviter la perte du greffon causée par la vigoureuse et dévastatrice réaction du rejet hyperaigu, en plus de détecter le développement d'anticorps spécifiques contre les cellules de l'allogreffe plusieurs mois avant que ne survienne une incidence de rejet (Pierce et al., 1975). Il existe quatre méthodes de détection d'anticorps anti-donneur (Norman, 2001a): 1) la technique standard du *crossmatch* conçu par le NIH (*National Institute of Health*); 2) la technique du *crossmatch* utilisant des anticorps humains; 3) la technique du *crossmatch* utilisant une population enrichie de lymphocytes B; et 4) la technique du *crossmatch* par cytométrie en flux. De manière générale, les trois premières méthodes sont des tests de cytotoxicité, lesquels requièrent des cellules du donneur, du sérum du receveur et le complément. Il a été démontré que les techniques du *crossmatch*, utilisant des anticorps humains ou une population enrichie de lymphocytes B, ont une plus grande sensibilité de détection que la technique standard de cytotoxicité lymphocytaire du NIH (Ross et al., 1975). Puisque les cellules endothéliales jouent un rôle important dans la réponse allogénique, il est tout à fait légitime d'évaluer ce type cellulaire. En effet, il a été démontré tout récemment qu'un test du *crossmatch* qui détecte les anticorps spécifiques contre les cellules endothéliales du donneur est un meilleur outil que le test standard du *crossmatch* (Vermehren et al., 2002). Enfin, la technique du *crossmatch* évaluée par cytométrie en flux est la méthode de détection la plus sensible mais aussi la moins spécifique de toutes les méthodes citées. En effet, elle peut détecter une infime présence d'anticorps anti-donneur dans le sérum du receveur, mais elle n'est pas considérée comme une technique de routine puisqu'elle est peu spécifique (Scornik, 1995).

Immunosuppression: une brève revue

Malgré les stratégies entreprises lors d'une transplantation clinique pour minimiser l'immunogénicité du greffon, voire pour réduire l'intensité de la réponse allogénique, un patient transplanté doit recevoir un traitement immunosuppresseur. L'immunosuppression clinique consiste à contrôler les réponses immunes indésirables

(par exemple, le rejet d'allogreffe) tout en évitant, dans la mesure du possible, les complications d'une immunodéficience (par exemple, les infections opportunistes et cancers). Il existe trois grands concepts de traitements immunosuppresseurs: 1) l'ablation des organes et tissus du système immunitaire (par exemple, l'élimination des lymphocytes via l'endommagement des organes lymphoïdes); 2) l'altération du déplacement ou de l'emplacement du lymphocyte; et 3) l'inhibition de la fonction lymphocytaire. Ces interventions peuvent être effectuées de manière physique ou pharmacologique, et être réversibles ou pas. De façon générale, l'immunosuppression est habituellement obtenue via l'utilisation d'agents immunosuppresseurs qui interrompent de manière réversible les fonctions des lymphocytes. Tout comme les techniques chirurgicales en transplantation et l'immunobiologie de la transplantation, l'immunosuppression en transplantation d'organes possède un historique bien à elle (Halloran, 2001b; Annexe 5).

Il existe une multitude de thérapies immunosuppressives, et elles peuvent être classées selon leur mécanisme d'action, leur fonction, leur origine ou la façon qu'elles ont été conçues (Annexe 6). Or, on retrouve dans la littérature une multitude de classifications quelques peu différentes les unes des autres. Le *American Society of Transplantation* suggère une classification complète et détaillée des thérapies immunosuppressives (Halloran et al. 2001b). Ces thérapies sont divisées en trois grands groupes, à savoir les thérapies physiques (par exemple, l'irradiation corporelle ou la thymectomie), les thérapies non-biologiques (par exemple, le tacrolimus, le sirolimus ou le mycophénolate mofétil), et les thérapies biologiques (par exemple, les protéines de fusion ou les anticorps monoclonaux). Le tableau 1.4.1 représente cette classification, mais avec modifications. Une attention particulière a été mise sur l'évaluation de nouvelles molécules biologiques et non-biologiques.

Depuis la nouvelle décennie, la nouvelle priorité en immunosuppression clinique est de réduire la toxicité tout en gardant une efficacité équivalente. Les nouveaux

protocoles d'immunosuppression se doivent d'être plus sécuritaires et efficaces, et la découverte ou la conception de nouveaux agents est donc nécessaire. La balance efficacité versus sécurité doit être égale, voire même pencher quelque peu en faveur de la sécurité. Il est devenu primordial de considérer les infections opportunistes, le risque de cancers, les maladies cardiovasculaires, voire les toxicités spécifiques des immunosuppresseurs, lors de l'élaboration de nouveaux protocoles d'immunosuppression. D'après Kahan (2002), il existe cinq aspects importants à considérer dans l'élaboration d'un nouvel agent immunosuppresseur: 1) l'efficacité ; 2) la sélectivité (pour minimiser les effets secondaires); 3) la fiabilité (constance dans le transport de l'agent); 4) la durabilité (potentiel d'utilisation à long terme chez le même patient) ; et 5) la réversibilité (capacité du système immunitaire à se récupérer). Malgré l'amélioration des résultats en transplantation d'organes avec l'utilisation des agents immunosuppresseurs de faible poids moléculaire (par exemple, la cyclosporine, le tacrolimus et le sirolimus), les directions futures pour le développement de nouveaux agents xénobiotiques seraient de disposer de molécules immunosuppressives et immunomodulatrices ayant quatre aspects importants, dont 1) un mécanisme d'action sélectif envers les réponses immunes adaptatives, et non les réponses immunes innées afin d'éviter les infections opportunistes et les complications néoplasiques; 2) une cible moléculaire restreinte aux cellules lymphoïdes afin d'éviter les effets indésirables sur d'autres types de cellules, de tissus ou d'organes; 3) une interaction synergique avec d'autres agents immunosuppresseurs conventionnels; et 4) une voie métabolique de biotransformation distinct de l'isoforme 3A4 du cytochrome P450 afin de minimiser les interactions médicamenteuses avec les immunosuppresseurs conventionnels comme le tacrolimus ou la cyclosporine, ce qui affectent les relations dose-effet (Kahan, 2002).

TABLEAU 1.4.1. Classification des thérapies immunosuppressives

THÉRAPIES PHYSIQUES	
Irradiation corporelle ou des organes lymphoïdes, drainage thoracique Thymectomie, splénectomie	
THÉRAPIES PHARMACEUTIQUES	
<u>Agents de faible poids moléculaire (agents non-biologiques)</u>	<u>AGENTS SOUS INVESTIGATION</u>
Glucocorticoïdes Cortisol, cortisone Prednisone, prednisolone, 6 α -méthylprednisolone Molécules se liant aux immunophilines Inhibiteurs de la calcineurine: cyclosporine, tacrolimus Inhibiteurs de mTOR: sirolimus, RAD Inhibiteurs de la synthèse de novo de nucléotides Synthèse de purines: inhibiteurs de l'IMPDH Mycophénolate mofétil, acide mycophénolique Mizorbine (Japon) Synthèse des pyrimidines: inhibiteurs du DHODH Bréquinar Leflunomide Azathioprine, antimétabolites Cyclophosphamide Déoxyspergualine (dérivés: trespérinus et LF15-0195) FTY720, myriocine (ISP-1)	Nouveaux inhibiteurs du signal 1: bloqueurs potassiques (TEA, 4-AP, charybdotoxine, margatoxine, CP-339,818, ShK-Dap ²²), inhibiteurs de NF κ B (SP100030, tépoxaline), inhibiteurs de protéines tyrosine kinase (genistéine, herbamycine A, PT1) Nouveaux inhibiteurs de la synthèse des nucléotides: VX-497, malononitrilamides (FK778), analogues de la déazaguanine (BCX-34) Nouveaux inhibiteurs du signal 2: dérivés méthylxantine (théophylline, pentophylline, A802715)
<u>Protéines</u>	
Anticorps contre les protéines immunitaires Polyclonaux (globuline antilymphocytaire) Monoclonaux murins (muronomab-CD3, anti-CD25, anti-LFA-1, anti-ICAM-1) Monoclonaux murins humanisés (muronomab-CD3 [HuM291], anti-IL-2R (anti-CD25: basiliximab/daclizumab), anti-LFA-1, anti-CD40L (Hu568, 5C7: arrêt) Protéines de fusion utilisant des propriétés naturelles Ligands solubles: anti-PSGL-1, ligand de P-sélectine (rPSGL-Ig), anti-CTLA4L (CTLA4Ig) Récepteurs solubles: récepteur d'IFN- γ Immunotoxines Immunotoxine anti-IL-2 (Ontak®) Immunotoxine anti-CD3 IVIg	
<u>Peptides</u>	
<u>Oligonucléotides antisenses</u> (anti-ICAM-1)	
<u>Thérapie génique</u>	
	<u>AGENTS SOUS INVESTIGATION</u> Nouveaux bloqueurs de costimulation: anti-ligand du CD40 (Hu568), anti-CD20 (rituximab). Nouveaux anticorps anti-molécules d'adhésion: anti-LFA-1 (anti-CD11a), anti-ICAM-1, anti-VLA-4 (WAY-160279) Nouvelles cibles: Bloqueur d'IL-15, campath-1H, anticorps anti-CD45 (MB23G2)

Modifié et traduit de Halloran et al., 2001b

1.5 THÉRAPIE COMBINÉE D'AGENTS IMMUNOSUPPRESSEURS

Il n'existe aucun agent immunosuppresseur idéal pour le traitement du rejet aigu d'allogreffe. La stratégie de combiner deux ou plusieurs agents immunosuppresseurs permet d'obtenir des effets thérapeutiques plus favorables que l'utilisation d'un agent en monothérapie. Les bénéfices peuvent être une augmentation de l'efficacité thérapeutique (par exemple, prolonger la survie des allogreffes), une diminution de la toxicité à caractère immune ou non-immune chez l'hôte, une augmentation de la sélectivité de l'effet ou l'amélioration de l'index thérapeutique (par exemple, minimiser les infections opportunistes et les désordres néoplasiques, réduire la néphrotoxicité, l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie, etc.), voire une réduction ou un ralentissement du processus de résistance à l'agent. Le principe pharmacologique de la thérapie combinée utilisant des doses sous-thérapeutiques d'immunosuppresseurs demeure tout à fait indiqué en transplantation d'organes puisqu'il s'agit d'une stratégie qui vise à augmenter l'efficacité thérapeutique des agents mis en combinaison tout en minimisant leurs effets secondaires dose-dépendants.

Limites des stratégies classiques et courantes

Cette stratégie simpliste mais très efficace ne date pas d'hier. Les premières thérapies combinées d'agents immunosuppresseurs pour traiter contre le rejet d'allogreffe remontent au milieu des années 60. À l'époque, l'utilisation combinée de l'azathioprine et de la prednisone a permis aux patients d'avoir recours à une thérapie immunosuppressive beaucoup moins drastique que le traitement par radiation. Cette combinaison a permis de diminuer l'incidence du rejet d'allogreffe, en même temps que de réduire le taux de mortalité dû aux infections opportunistes et à la toxicité des médicaments. Avec l'arrivée de nouveaux agents immunosuppresseurs, que ce soit des molécules déjà connues mais pour lesquelles on y a identifié de nouvelles propriétés ou alors des molécules nouvellement découvertes, le principe de la thérapie combinée a pris de toute son ampleur en immunosuppression clinique. Promptement, l'association

de la cyclosporine et de la prednisone devenait une avenue thérapeutique intéressante puisque ce traitement permet d'inhiber la production d'IL-2 en plus d'une inhibition de l'expression génique d'autres cytokines proinflammatoires (par exemple, l'IL-1, l'IL-6, l'IFN- γ et le TNF- α). Cependant, le manque de spécificité et de sélectivité des glucocorticostéroïdes et le besoin d'utiliser des doses élevées de cyclosporine rendaient cette combinaison beaucoup moins attrayante qu'on l'avait anticipé, compte tenu des effets indésirables observés (Kahan, 1991). Il n'y a pas si longtemps, les cliniciens traitaient les patients transplantés avec la triple thérapie qui consiste en une combinaison de cyclosporine, de glucocorticostéroïdes et d'azathioprine. Cette triple association a permis l'utilisation de doses plus faibles de chaque agent, permettant ainsi de minimiser les effets indésirables dose-dépendants de chaque agent. L'administration de la triple thérapie demeure toujours le traitement immunosuppresseur standard contre le rejet de d'allogreffe. Cependant, dans plusieurs cas, la cyclosporine est remplacée par un autre inhibiteur de la calcineurine, le tacrolimus, voire l'azathioprine peut aussi être remplacé par le mycophénolate mofétil. Néanmoins, bien que cette thérapie combinée ait apporté d'excellents résultats en terme de diminution de l'incidence d'épisodes de rejet aigu, un traitement qui inclut l'utilisation de glucocorticostéroïdes n'est pas idéal puisque ces agents causent des effets indésirables touchant plusieurs systèmes physiologiques. De plus, les patients qui répondent moins bien aux effets immunosuppresseurs de la cyclosporine (par exemple, les personnes de race noire) devaient recevoir de plus fortes doses initiales afin d'obtenir le même niveau d'immunosuppression, mais des effets secondaires importants apparaissaient.

Avec la découverte des propriétés immunosuppressives du tacrolimus à la fin des années 80, les cliniciens et scientifiques évaluaient l'efficacité de cet agent en combinaison avec d'autres immunosuppresseurs connus. Parmi ces associations, on retrouvait, entre autre, la thérapie combinée du tacrolimus et de la cyclosporine qui a apporté d'intéressants résultats en terme d'efficacité. Des études menées par Todo et al. (1988) ont démontré que cette combinaison d'inhibiteurs de la calcineurine était plus

efficace qu'une monothérapie au tacrolimus ou à la cyclosporine pour prolonger la survie des allogreffes cardiaques, rénales et hépatiques chez le rat. Cependant, aucune étude n'a évalué les effets secondaires de cette thérapie combinée. Ce n'est que plus tard qu'on a démontré que les effets secondaires du tacrolimus et de la cyclosporine sont causés par leur mécanisme d'action immunosuppresseur, c'est-à-dire l'inhibition de la calcineurine (Dumont et al., 1992). Non seulement les effets immunosuppresseurs étaient synergiques dans le cas de l'association du tacrolimus et de la cyclosporine, mais les effets indésirables l'étaient également. Les cliniciens ont alors abandonné l'idée d'utiliser cette thérapie combinée comme avenue thérapeutique contre le rejet aigu d'allogreffe. En outre, Tanabe et al. (1994) ont démontré que la combinaison du tacrolimus avec un inhibiteur de la synthèse des nucléotides (mizoribine, azathioprine ou mycophénolate mofétil) permettait de prolonger la survie d'allogreffes de manière additive ou synergique. Plus récemment, la combinaison du tacrolimus et du mycophénolate mofétil a été démontrée à produire des effets synergiques dans la prévention et le renversement du rejet aigu (Ahsan et al., 1997; Antoniou et al., 1996; Eckhoff et al., 1998; Roth et al., 1998; Taylor, 1997). Plusieurs autres combinaisons incluant la cyclosporine, le sirolimus et le mycophénolate mofétil ont été évaluées expérimentalement, et certaines d'entre elles ont fait l'objet d'études cliniques multicentriques. Entre autre, la thérapie combinée de la cyclosporine et du mycophénolate mofétil a démontré une efficacité contre le rejet de greffe de peau allogénique chez le rat (Benhaim et al., 1996). Kahan et al. (1993) ont rapporté que des traitements combinant la cyclosporine et des agents antimétaboliques (6-mercaptopurine, mizoribine ou mycophénolate mofétil) produisent des effets additifs dans la prolongation de l'allogreffe cardiaque chez le rat. La combinaison du bréquinar et de la cyclosporine ou du sirolimus produit aussi des effets synergiques dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. De plus, un traitement combiné de la cyclosporine et du sirolimus a été investigué par plusieurs groupes, et les résultats des études *in vitro* et *in vivo* démontrent des effets synergiques pour prévenir contre le rejet aigu (Chen et al., 1992; Kahan et al., 1991; Stepkowski et al., 1993, 1996; Wasowska et al., 1997). En outre,

certaines études évaluant des combinaisons d'anticorps monoclonaux avec des immunosuppresseurs à faible poids moléculaire ont rapporté que ces thérapies produisent des effets synergiques dans la prolongation de la survie des allogreffes cardiaques (anticorps monoclonal anti-LFA-1/ICAM-1 et mycophénolate mofétil) et dans l'induction de la tolérance (anticorps monoclonal anti-CD2 et tacrolimus) (Chavin et al., 1994; Takazawa et al., 1996). Des triples thérapies ont également été évaluées. La thérapie combinée du bréquinar, de la cyclosporine et du sirolimus produit des effets synergiques *in vitro* et *in vivo* dans la prévention du rejet aigu (Kahan et al., 1993; Stepkowski et al., 1993; Tu et al., 1995). Du côté clinique, la combinaison de la cyclosporine, de la prednisone et du mycophénolate mofétil procurait des effets synergiques significatifs (European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group, 1995; Wiesel et al., 1998). Dans un modèle de xénotransplantation, la thérapie combinée du leflunomide, de la cyclosporine et du mycophénolate mofétil a été efficace pour prolonger la survie des îlots pancréatiques xénogreffes (Wennberg et al., 1997). Durant la dernière décennie, les stratégies de combinaisons impliquaient l'administration de doses plus ou moins élevées d'agents immunosuppresseurs. Cependant, le prix à payer pour obtenir une grande efficacité immunosuppressive demeure l'induction d'importants effets secondaires chez les receveurs. Or, il est important d'éviter une immunosuppression excessive qui favorise les infections opportunistes et les cancers. Une alternative thérapeutique intéressante vise à utiliser une association synergique d'immunosuppresseurs à des doses individuelles sous-thérapeutiques et dépourvues d'effets indésirables dose-dépendants. Le concept d'interactions synergiques a été proposé par Hitchings en 1973 (Kahan et al., 1995). L'auteur a démontré que l'utilisation concomitante de sulfaméthoxazote et de triméthoprimine procurait un effet thérapeutique significatif pour prévenir contre les maladies infectieuses, en plus de permettre la réduction des doses individuelles des deux antibiotiques. Par la suite, le principe de l'effet médian a été démontré comme étant très utile pour déterminer le type d'interaction entre des agents immunosuppresseurs. Parmi les agents les plus connus en clinique, la combinaison de la cyclosporine et du sirolimus a démontré une

très forte synergie dans des tests de prolifération et de cytotoxicité, voire dans des modèles d'allogreffes cardiaques, rénales et pancréatiques (Kahan et al., 1995; 1991). La thérapie combinée de la cyclosporine et du sirolimus est reconnue comme étant fortement synergique pour prévenir contre le rejet aigu d'allogreffe. Cependant, un traitement efficace de cyclosporine requiert parfois des doses élevées, et compte tenu que les effets indésirables de cet agent (par exemple, la néphrotoxicité, la neurotoxicité, l'hyperglycémie et l'hypertension) sont dose-dépendants, cette thérapie combinée n'est peut-être pas aussi édifiant que l'on croyait à l'époque.

Stratégies potentielles

Le tacrolimus est un agent inhibiteur de la calcineurine qui a été rapporté à être plus efficace que la cyclosporine (même à formulation émulsive, Neoral®) à prévenir contre le rejet aigu d'allogreffe durant la première année posttransplantation, chez des patients transplantés hépatiques (O'Grady et al., 2002). De plus, Trompeter et al. (2002) ont récemment rapporté qu'un traitement au tacrolimus est plus efficace qu'une thérapie à la cyclosporine en émulsion dans la prévention contre le rejet aigu d'allogreffes rénales chez des patients pédiatriques. Quant aux profils de toxicité de la cyclosporine et du tacrolimus, ils semblent être similaires selon Trompeter et al. (2002), tandis que O'Grady et al. (2002) ont rapporté que le tacrolimus semble être un peu plus diabétogénique que la cyclosporine, voire Boots et al. (2001) ont rapporté que les patients transplantés rénaux traités avec le tacrolimus ont un meilleur profil cardiovasculaire (par exemple, une plus faible incidence d'hypertension et d'hypercholestérolémie) que ceux traités avec la cyclosporine. Il va sans dire que le remplacement de la cyclosporine avec le tacrolimus est justifié. Dans notre groupe, nous avons démontré que la thérapie combinée du tacrolimus et du sirolimus permet de prolonger de manière synergique la survie des allogreffes cardiaques et rénales chez le rat et le primate non-humain (Vu et al., 1998; Qi et al., 1999). En transplantation clinique, McAlister et al. (2001; 2002) ont démontré qu'une combinaison de faibles doses de tacrolimus et de sirolimus permet également de prolonger de façon synergique la

survie des allogreffes chez des patients transplantés hépatiques, et des études de pharmacocinétiques évaluant cette thérapie combinée prouvent qu'elle est stable et sécuritaire. En outre, Shapiro et al. (2002) ont démontré que la thérapie combinée à faibles doses de tacrolimus et de sirolimus permet de réduire de manière synergique l'incidence de diabète chez des souris diabétiques non-obèses. De plus, des études ont rapporté que cette combinaison permet de réduire significativement l'hyperplasie intinale expérimentale, et l'hyperlipidémie et le diabète chez des patients pédiatriques transplantés rénaux (Wallet et al., 2002; El-Sabrou et al., 2002). La combinaison du sirolimus et du mycophénolate mofétil représente un autre traitement immunosuppresseur prometteur. L'avantage premier de cette thérapie combinée est qu'elle est exempte d'inhibiteur de la calcineurine, et donc ne cause point de néphrotoxicité. En outre, le sirolimus et le mycophénolate mofétil sont des agents immunosuppresseurs de la nouvelle génération qui ont fait leurs preuves dans la prévention du rejet aigu d'allogreffe.

Tel que mentionné ultérieurement, il existe une panoplie de nouvelles petites molécules immunosuppressives avec des profils thérapeutiques très intéressants. Parmi eux, on retrouve le malononitrilamide FK778 qui est un nouveau dérivé du leflunomide. Une thérapie combinée du malononitrilamide avec le tacrolimus (l'agent *gold standard* en immunosuppression) serait une avenue thérapeutique intéressante. Outre les agents à faible poids moléculaire, les immunosuppresseurs biologiques représentent l'avenir dans l'immunosuppression clinique. Ces agents possèdent une plus grande sélectivité envers la cible moléculaire, et donc ils causent beaucoup moins d'effets indésirables. Depuis le nouveau millénaire, le mot d'ordre en transplantation clinique demeure la sécurité des nouveaux traitements immunosuppresseurs. Non seulement l'efficacité d'un agent est importante, mais son profil de toxicité est d'autant plus considéré. Les effets indésirables des inhibiteurs de la calcineurine deviennent un problème capital en transplantation d'organes puisqu'ils sont les agents de base en immunosuppression. Leur utilisation limitée ou en combinaison avec d'autres agents

efficaces dépourvus de toxicités similaires représente les nouvelles tendances en immunosuppression expérimentale. De la catégorie des nouveaux agents synthétiques et biologiques avec des propriétés immunosuppressives, on retrouve des inhibiteurs de molécules d'adhésion, respectivement, le WAY-160279, un antagoniste du VLA-4, et le rPSGL-Ig, une protéine de fusion inhibitrice de la P-sélectine. De plus, cette nouvelle catégorie d'agents anti-rejet demeure très prometteuse, puisque ces derniers minimisent les dommages causés par l'ischémie/reperfusion, un facteur non-immunologique qui joue un rôle important dans le développement du rejet aigu et chronique d'allogreffes vascularisées. Il serait alors justifié d'évaluer la thérapie combinée du WAY-160279 ou du rPSGL-Ig avec un agent immunosuppresseur conventionnel ayant déjà fait ses preuves. Somme toute, la thérapie combinée de faibles doses d'agents immunosuppresseurs appropriés est une stratégie qui permet d'atteindre deux buts ultimes en transplantation d'organes: l'augmentation de l'efficacité thérapeutique et la réduction des effets secondaires d'ordre immunologique (infections opportunistes et désordres néoplasiques) ou non-immunologique (néphrotoxicité, hypertension, diabète, hyperlipidémie, etc.). En transplantation clinique, il est tout à fait acceptable qu'une nouvelle thérapie combinée immunosuppressive soit dépourvue d'effets secondaires importants sans pour autant être beaucoup plus efficace à prolonger la survie d'allogreffe que les traitements existants. Cependant, le contraire n'est point admissible puisque l'emphasis est désormais mise sur la sécurité et non l'efficacité.

1.6 AGENTS À FAIBLE POIDS MOLÉCULAIRE SE LIANT AUX IMMUNOPHILINES

Cyclosporine

La cyclosporine est une molécule dérivée de l'espèce fongique *Tolypocladium inflatum*, qui a d'abord été isolée pour ses propriétés antibiotiques (Zocher et al., 1986). La cyclosporine est un décapeptide cyclique naturel hautement aliphatique qui comporte un groupement méthyle et un lien éthylène à chacun des dix acides aminés (Petchner et al., 1976) (Figure 1.6.1). Durant les années 70, une série d'expériences effectuées par Jean-François Borel et son équipe ont démontré que la cyclosporine possède des propriétés sélectives inhibitrices sur la prolifération des lymphocytes T en culture, sans toutefois causer des effets myélotoxiques (par exemple, une anémie causée par la dépression des érythrocytes et des plaquettes) chez les rongeurs après traitement oral, tels que rencontrés avec les agents immunosuppresseurs disponibles à l'époque (Borel et al., 1976; 1977). Dans des modèles précliniques de transplantation d'organes vascularisés, Green et al. (1978) ont démontré qu'un traitement à court terme (quatre semaines) de cyclosporine permet de prolonger de manière extensive (cinq à six mois) la survie des allogreffes rénales chez le lapin. En outre, Calne et al. (1978a) ont rapporté que la cyclosporine permet de prolonger la survie des allogreffes orthotopiques cardiaques chez le porc. Suite aux résultats prometteurs, la cyclosporine fut introduite en clinique dans la prévention du rejet aigu chez des patients transplantés rénaux (Calne et al., 1978b). La découverte de ce nouvel immunosuppresseur et son introduction en clinique ont révolutionné le domaine de la transplantation d'organes en améliorant de manière significative la survie des allogreffes de donneurs cadavériques (*Preliminary results of a European multicentre trial*, 1982). En effet, il a été rapporté que les taux de survie d'allogreffes rénales ont passé de 50% à plus de 90% durant la première année posttransplantation (Helderman, 2001; Keown, 1999). Cependant, la cyclosporine ne semblait avoir aucun impact significatif sur la survie à long terme des allogreffes vascularisées. La cyclosporine n'a pas seulement apporté des bénéfices en transplantation rénale, mais elle a également rendu possible la transplantation

cardiaque, hépatique, pancréatique et pulmonaire comme applications cliniques pour des patients défaillants (Rynasiewicz et al., 1982; Keogh et al., 1992; Venuta et al., 1993; Fung et al., 1987). Pendant plus de deux décennies, la cyclosporine demeurait l'agent immunosuppresseur de base en immunosuppression clinique.

Propriétés immunosuppressives: mécanisme d'action moléculaire et cellulaire.

La cyclosporine est un immunosuppresseur non-biologique à faible poids moléculaire (1.202 kD), qui possède la propriété de traverser la membrane des cellules en général, notamment les lymphocytes, par diffusion ou par transport actif via le récepteur LDL-cholestérol (à fortes concentrations) (Block et al., 1983). Une fois présente dans le cytoplasme du lymphocyte, la cyclosporine se lie à la cyclophiline, une protéine de transport de 17 KD qui possède une activité enzymatique cis-trans-peptidyl-prolyl isomérase (nécessaire pour le repliement protéinique), pour former le complexe cyclosporine/cyclophiline (Handschumacher et al., 1984). La cyclophiline est abondamment exprimée sur différents tissus de mammifères, et la cyclosporine s'y attache avec une forte affinité ($K_D = 6 \text{ nM}$) (Koletsky et al., 1986). Quesniaux et al. (1987) ont d'ailleurs démontré que l'activité immunosuppressive de la cyclosporine est liée à sa capacité à d'interaction avec la cyclophiline. Le complexe cyclosporine-cyclophiline se lie ensuite à la calmoduline, une protéine qui capte le calcium, et dont la présence est absolument requise pour une fonction cellulaire normale (Colombani et al., 1985). Le complexe cyclosporine-cyclophiline-calmoduline-calcium se lie ensuite à la calcineurine, une protéine sérine-thréonine phosphatase dépendante du calcium qui joue un rôle important dans les voies d'activation du lymphocyte, et bloque son activité enzymatique, d'où son appellation « inhibiteur de la calcineurine » (Klee et al., 1979) (Figure 1.6.2). En effet, Clipstone et al. (1992) ont identifié la calcineurine comme étant une enzyme primordiale dans la voie de signalisation du lymphocyte T. Suite à l'augmentation du calcium intracellulaire causée par l'activation de la voie de signalisation impliquant la PLC γ 1 déclenchée par la reconnaissance allogénique via la voie du TCR/CD3, la calcineurine devient activée, et elle catalyse la déphosphorylation

du facteur nucléaire NFAT cytosolique, lui permettant ainsi d'entrer dans le noyau et s'attacher à des sites de liaison à l'ADN spécifiques au NFAT dans la région du promoteur de plusieurs cytokines et facteurs de croissance importants du lymphocyte T (par exemple, l'IL-2), ainsi que des molécules de costimulation (par exemple, le CD40L) (Jain et al., 1993). La liaison du complexe cyclosporine-cyclophiline à la calcineurine inhibe l'activité phosphatase de cette dernière, et prévient donc la déphosphorylation du NFAT cytosolique. Le NFAT cytosolique à l'état phosphorylé ne peut traverser la membrane nucléaire, voire donc ne peut s'attacher aux séquences d'ADN du promoteur des gènes des protéines nécessaires à l'activation du lymphocyte T (Jain et al., 1993). En conséquence, la cyclosporine prévient la transcription de l'ARN messager codant pour une variété de cytokines incluant l'IL-1, l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, l'IFN- γ et le TNF- α (Bunjes et al., 1981; Pawelec et al., 1983; Kronke et al., 1984; Warbrick et al., 1997; Viale et al., 1992; Kalman et al., 1983). En outre, il a été rapporté que la cyclosporine inhibent aussi la phosphorylation d'autres facteurs de transcription non spécifiques aux lymphocytes T comme AP-1, AP-3, OAP, Oct-1 et NF κ B (de Mattos, 1996). Il se produit alors une inhibition de l'expression des cytokines qui jouent un rôle important dans le processus d'activation du lymphocyte T, incluant les signaux biochimiques en aval de la synthèse d'ADN, la division cellulaire, la synthèse des proto-oncogènes, et la production de facteurs de croissance additionnels. En conséquence, les lymphocytes répondant à l'alloantigène sont paralysés au début du cycle cellulaire (durant la phase G₀-G₁), et ils acquièrent donc la possibilité de retourner à un état quiescent. Or, il se produit une inhibition des événements précoces de la reconnaissance allogénique, une réduction dans l'expansion clonale des lymphocytes T alloréactifs, voire une inhibition de la synthèse des cytokines importantes impliquées dans le rejet d'organes. Cependant, la cyclosporine n'inhibe pas la synthèse d'autres cytokines (par exemple, l'IL-7 et l'IL-15) impliquées dans le rejet aigu et qui ne sont pas produites par des lymphocytes T (Hock et al., 1991; Pavlakis et al., 1996). L'IL-7 et l'IL-15 sont produites, respectivement, par les cellules stromales du thymus, de la rate et de la moelle osseuse, et des cellules mononucléées périphériques du sang (Abbas et al., 2000). C'est ce qui explique que

malgré la présence de la cyclosporine, les cytokines peuvent s'attacher aux récepteurs à la surface des lymphocytes T et déclencher les voies de signalisation impliquées dans la progression du cycle cellulaire (Helderman, 2001). Ce phénomène pourrait expliquer les épisodes de rejet aigu chez des patients transplantés, malgré qu'ils soient traités avec la cyclosporine. En parallèle à l'inhibition de la synthèse de certains facteurs de croissance et cytokines, la cyclosporine a été rapportée à causer l'activation du gène de TGF- β et à promouvoir la production de TGF- β (Prashar et al., 1995). Espevik et al. (1987) ont d'ailleurs démontré que le facteur de croissance TGF- β possède des propriétés immunosuppressives. Puisque le TGF- β possède une forte activité immunosuppressive intrinsèque, il a été suggéré qu'il puisse contribuer aux effets immunosuppresseurs de la cyclosporine (Khanna et al., 1994). Notamment, Brabletz et al. (1993) ont démontré que la cyclosporine et le TGF- β inhibent l'activité du gène de l'IL-2 en se liant au même site au niveau du promoteur. Toutefois, le TGF- β possèdent plusieurs autres effets biologiques comme le développement et la formation de la matrice extracellulaire, l'expression à la hausse de l'endothéline-1 dans les cellules endothéliales, l'augmentation de la fibrose interstitielle et la vasoconstriction causant l'hypertension. De part ces propriétés biologiques, il semblerait que le TGF- β soit responsable des effets secondaires importants de la cyclosporine, tels la néphrotoxicité et l'hypertension (Shehata et al., 1995; Shihab et al., 1996; Hutchinson et al., Helderman, 2001; Keown, 1999).

Évaluations précliniques. La cyclosporine a été testée dans plusieurs modèles de transplantation d'organes vascularisés chez les rongeurs et les primates non humains (Borel et al., 1978; Calne et al., 1978a; Green et al., 1978; Jamieson et al., 1979; McMaster et al., 1980; Reitz et al., 1980; Bom-van Noorloos et al., 1984; Mackenzie et al., 1982). En effet, Calne et al. (1978a) ont rapporté que la cyclosporine prévient le rejet aigu dans un modèle de transplantation cardiaque chez le porc. De plus, Green et al. (1978) ont démontré qu'un traitement de cyclosporine permet de prolonger la survie des allogreffes rénales chez le lapin. La cyclosporine a également été évaluée à prévenir

contre le rejet aigu dans un modèle de transplantation pancréatique chez le chien (McMaster et al., 1980). En outre, Jamieson et al. (1979) ont rapporté que la cyclosporine prévient le rejet aigu dans un modèle de transplantation cardiaque chez le primate. Reitz et al. (1980) ont également démontré l'effet bénéfique de la cyclosporine à prolonger la survie d'allogreffe cardiaque-pulmonaire chez le primate. Enfin, l'effet anti-rejet de la cyclosporine a été démontré dans des modèles de transplantations hépatiques et intestinales (Bom-van Noorloos et al., 1984; Mackenzie et al., 1982). Enfin, l'effet immunosuppresseur de la cyclosporine a été évalué à prévenir contre le rejet de xénogreffe et dans des désordres immunologiques comme les maladies autoimmunes et les réactions d'hypersensibilité de type retardé. En effet, il a été rapporté que la cyclosporine prévient la maladie de la greffe contre l'hôte chez des rats (Markwick et al., 1979). En outre, Won et al. (1994) ont démontré que la cyclosporine est un traitement très efficace contre le psoriasis sévère récalcitrant en inhibant l'expression génique des cytokines IL-1 et IL-8, qui sont sécrétées par les kératinocytes murins et humains.

Autres propriétés bénéfiques contre le rejet d'organe. Les dommages causés par l'ischémie/reperfusion sont inévitables en transplantation d'organes vascularisés. Il a été rapporté que la cyclosporine réduit significativement les dommages causés par l'ischémie/reperfusion en bloquant l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale, diminuant ainsi les injures cytotoxiques reliées au découplage des réactions oxydatives, à l'hydrolyse de l'ATP et la disruption de la membrane cellulaire (Broekemeier et al., 1995; Lemasters 1999). Di Lisa et al. (2001) ont récemment démontré que l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale causé par l'ischémie/reperfusion induit la mort des myocytes cardiaques via une déplétion en NAD⁺ mitochondriale et cellulaire, et qu'un traitement à la cyclosporine permet d'éviter cette déplétion en NAD⁺. De plus, Halestrap et al. (1997) ont rapporté que la cyclosporine prévient des injures de l'ischémie/reperfusion dans un modèle de cœur isolé chez le rat, en bloquant l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale. Tout récemment, dans une élégante étude effectuée par Raymond et al.

(2003), les auteurs ont démontré qu'en bloquant le pore de transition de perméabilité mitochondriale, la cyclosporine inhibe non seulement l'apoptose mais redirige la mort cellulaire vers la nécrose des cellules endothéliales. Or, une mort nécrotique est accompagnée d'une réponse inflammatoire qui peut empirer le dommage endothélial artériel, accroître l'intensité de la réponse immune non-spécifique contre l'allogreffe, voire promouvoir l'athérosclérose d'allogreffe.

Considérations cliniques. 1) Effets pharmacocinétiques: Comme la cyclosporine possède une structure chimique de dix acides aminés à caractère hautement aliphatique, elle est insoluble dans une solution aqueuse, compliquant ainsi son utilisation en clinique (Petchner et al., 1976). Or, la cyclosporine requiert un véhicule particulier à base d'huile avec une absorption dépendante de la vidange gastrique, des réserves de sels et de bile et des micelles au niveau intestinal (Holt et al., 2000). La cyclosporine est commercialisée sous deux types de formulation. La formulation initiale (Sandimmune®) possède des caractéristiques d'absorption hautement problématiques, comme une absorption qui est affectée par le temps d'ingestion et la nature des aliments ingérés, une absorption dépendante de la sécrétion biliaire, et une faible absorption chez les enfants, les personnes de races noires et les personnes diabétiques (Heldermann, 2001). La seconde formulation (Neoral®) consiste en une microémulsion qui n'a aucune interaction avec les aliments, et dont l'absorption ne requiert pas la sécrétion biliaire (Dunn et al., 2001). De plus, puisque les caractéristiques d'absorption en sont grandement améliorées, voire même chez les pires absorbeurs de Sandimmune®, les variations intra- et interindividuelles de l'exposition du patient à la cyclosporine en sont nettement réduites (Helderman, 2001). En clinique, une stratégie pour prédire le niveau d'exposition du patient à la cyclosporine consiste à effectuer un monitoring thérapeutique de l'agent. En effet, il a été démontré, chez des patients transplantés rénaux et hépatiques, qu'une simple mesure sanguine deux heures après l'administration de Neoral® (C₂) est un prédicateur de l'exposition du patient à l'agent beaucoup plus précis que l'évaluation des concentrations plasmatiques en C₀, voire que

l'utilisation de la mesure C_2 permet de réduire significativement l'incidence et la sévérité du rejet aigu cellulaire chez les patients sous cyclosporine (Levy, 2001). Habituellement, les concentrations sanguines de cyclosporine sont ciblées entre 250 ng/mL et 300 ng/mL chez les transplantés rénaux (les concentrations étant plus élevées pour les transplantés cardiaques et hépatiques), et elles sont réduites à 125-150 ng/mL après la première année posttransplantation (Helderman, 2001). La cyclosporine peut être utilisée en thérapie d'induction (8-12 mg/kg/jour) en combinaison avec d'autres agents ou seulement en thérapie de maintien. En effet, en raison du profil néphrotoxique de la cyclosporine, certains centres de transplantation préfèrent attendre que le taux de filtration glomérulaire soit stable chez les patients transplantés rénaux avant de les traiter à la cyclosporine.

2) Interactions médicamenteuses: Une préoccupation clinique de la cyclosporine est que cet agent est principalement métabolisé par l'isoenzyme 3A4 du cytochrome P450 (CYP3A4), un groupe d'enzymes à fonction oxydase retrouvées dans les microsomes hépatiques et les muqueuses de l'intestin grêle (Combalbert et al., 1989). Les métabolites de la cyclosporine sont nettement moins toxiques et immunosuppresseurs que la molécule mère, et tous deux sont excrétés par l'hépatocyte via l'intestin comme route d'élimination principale et via le rein comme seconde voie d'élimination (Christians et al., 1991). Puisque le CYP3A4 métabolise une panoplie de médicaments comme certains bloqueurs calciques (par exemple, le diltazem et le vérapamil), des antibiotiques (par exemple, l'érythromycine, le kétoconazole et la tétracycline), des anticonvulsivants (par exemple, la phénytoïne et le phénobarbital), et d'autres agents (par exemple, le tacrolimus, le sirolimus, l'alcool, la cimetidine et l'oméprazole), le risque d'interactions médicamenteuses est important (Tang et al., 2001). Certains agents vont augmenter les concentrations sanguines de cyclosporine (augmentant ainsi les risques d'infections opportunistes et de cancers puisque le patient est surimmunosupprimé, mais aussi les effets secondaires non-immunitaires), et d'autres vont plutôt les réduire (mettant ainsi le patient en danger de rejeter son greffon). Or, une attention particulière se doit d'être prise puisque les

patients transplantés prennent habituellement différentes médications (Helderman, 2001).

Effets secondaires et toxicités. Malgré que la cyclosporine soit un puissant immunosuppresseur, elle n'est pas sans occasionner d'effets indésirables chez le patient receveur. En effet, le problème réside au fait que la cyclosporine exerce ses effets immunosuppresseurs via les mêmes mécanismes qu'empruntent les effets secondaires, c'est-à-dire en bloquant la voie de la calcineurine, une protéine multifonctionnelle. Les effets secondaires uniques à la cyclosporine sont l'hypertrichose, l'hirsutisme, l'hyperplasie gingivale, voire une altération dans le transport tubulaire causant une rétention d'eau et de sodium, une hyperkaliémie (due à une diminution de l'excrétion du potassium), et une augmentation des niveaux d'acides uriques. En effet, il a été démontré que la cyclosporine cause une hyperkaliémie chez des patients transplantés en réduisant l'activité enzymatique des co-transporteurs Na^+/K^+ ATPase et H^+/K^+ ATPase dans des cellules rénales (Deppe et al., 1997). La cyclosporine cause des effets secondaires supplémentaires qu'elle partage avec le tacrolimus, un autre inhibiteur de la calcineurine, comme la neurotoxicité (par exemple, des tremblements et la migraine) et l'hépatotoxicité (à des grandes concentrations sanguines). Un autre effet secondaire causé par les inhibiteurs de la calcineurine, mais de manière plus importante par la cyclosporine est l'hypertension. En effet, il a été rapporté que plus de 85% des patients transplantés rénaux traités à la cyclosporine devront tôt ou tard recourir à un traitement antihypertenseur. Les causes de l'hypertension induite par la cyclosporine sont multifactorielles, et elles impliquent principalement: 1) l'augmentation de la résistance des vaisseaux due à une élévation de calcium intracellulaire; 2) une rétention d'eau et de sodium; et 3) une augmentation de la sensibilité à une stimulation adrénergique. De plus, l'augmentation de la tension artérielle peut être due à une interaction de la cyclosporine avec le système rénine-angiotensine causant l'inhibition de la production des métabolites de l'oxyde nitrique, la production de l'endothéline vasoconstrictrice et de la rénine causant la production d'angiotensine II (Lassila, 2002). De loin, l'effet

secondaire le plus néfaste de la cyclosporine demeure la néphrotoxicité. Le syndrome le plus communément observé en clinique est une néphrotoxicité aiguë dose-dépendante représentée par une vasoconstriction des capillaires intrarénales et des artères afférentes et efférentes, causant une diminution de la clairance rénale. Cette vasoconstriction significative peut causer la défaillance rénale, voire même la perte de l'allogreffe. Or, la cyclosporine peut causer le syndrome de fonction retardée du greffon après l'implantation chirurgicale, voire même induire le syndrome primaire non-fonctionnel du greffon. Un second syndrome fréquemment observé en clinique demeure une altération des cellules endothéliales induite par la cyclosporine. Le dommage endothélial est accompagné d'une anémie hémolytique microangiopathique qui est caractérisée par une thrombocytopénie, une augmentation des niveaux de déshydrogénase lactique et une réduction des taux d'hémoglobine et de plaquettes. Enfin, un autre syndrome de néphrotoxicité induite par la cyclosporine observé en clinique est le syndrome du dysfonctionnement chronique du greffon, qui est morphologiquement caractérisé par une sclérose au niveau des artérioles et des artères de petit calibre et une fibrose interstitielle tubulaire. La pathogenèse du dysfonctionnement chronique du greffon peut être l'impact d'une ischémie intrarénales prolongée, résultant de la vasoconstriction des artérioles et des artères. De plus, la production de TGF- β induite par la cyclosporine semble en être un facteur causal puisqu'il a été rapporté que ce facteur de croissance engendre la vasoconstriction, la production d'angiotensine II, l'hypertension et la formation de la matrice extracellulaire accompagnée d'une fibrose (Pirsch, 1998; Helderman, 2001; de Mattos et al., 2000). L'inhibition de la biosynthèse de l'oxyde nitrique fait aussi partie des explications des dysfonctions rénales induites par la cyclosporine. D'ailleurs, Andoh et al. (1996) ont rapporté qu'une diminution des médiateurs vasodilatateurs causée par le tacrolimus et la cyclosporine (via le blocage de la calcineurine), particulièrement l'oxyde nitrique, joue un rôle important dans la pathogenèse de la vasoconstriction rénale induisant la néphrotoxicité. En outre, il a été démontré que la cyclosporine induit une peroxydation lipidique dans les microsomes rénaux de rat en endommageant la membrane cellulaire

(Inselmann et al., 1988). D'autres effets secondaires de la cyclosporine ont également été rapportés. Tran et al. (2000) ont d'ailleurs démontré que la cyclosporine empêche le captage de la créatine en altérant l'expression du transporteur de la créatine à la surface des cellules musculaires. Les auteurs suggèrent qu'une exposition chronique à la cyclosporine peut causer des myopathies, dues à une déplétion de la créatine dans les cellules musculaires lisses cardiaques, chez les patients transplantés. Toujours au niveau cardiaque, il a récemment été suggéré que la cyclosporine peut causer la calcification myocardique, la dysfonction contractile et l'altération des activités intracellulaires impliquant calcium via l'inhibition d'une pompe Na^+/K^+ ATPase similaire à celle retrouvée dans le rein (Mardini et al., 2001). Il a été rapporté qu'une administration chronique de cyclosporine altère le métabolisme osseux chez le rat en bloquant les mécanismes de couplage entre la formation et la résorption osseuse (Kawana et al., 1996).

Tacrolimus

En 1984, des chercheurs japonais ont découvert et isolé une nouvelle molécule qui s'avérera à avoir des propriétés immunosuppressives puissantes, le tacrolimus, connu à l'époque sous le nom FK506 (Kino et al., 1987; Ochiai et al., 1987). Le tacrolimus est un macrolide antibiotique fongique dérivé de *Streptomyces tsukubaensis*. Il possède une structure chimique de faible poids moléculaire (0.822 kD) qui est semblable à celle du sirolimus (Figure 1.6.1). Dès sa découverte, le tacrolimus a suscité beaucoup d'intérêt en transplantation clinique puisqu'il représente une alternative thérapeutique à la cyclosporine. Le tacrolimus est maintenant utilisé comme immunosuppression primaire en transplantation hépatique et rénale, en plus d'être évalué cliniquement en transplantation cardiaque, pulmonaire, pancréatique et intestinale (Plosker et al., 2000).

Propriétés immunosuppressives: mécanisme d'action moléculaire et cellulaire.

Dans des réactions lymphocytaires mixtes, le tacrolimus a été démontré à causer des effets antiproliférateurs chez les lymphocytes sans toutefois inhiber de manière

universelle la prolifération des cellules myéloïdes (Goto et al, 1991). Malgré leurs structures chimiques complètement différentes, le tacrolimus et la cyclosporine sont de la même catégorie d'agents immunosuppresseurs, celle des inhibiteurs de la calcineurine. En effet, le tacrolimus exerce ses effets immunosuppresseurs par les mêmes mécanismes d'action que la cyclosporine, soit l'inhibition de l'activité enzymatique de la calcineurine et la production de TGF- β (Bruserud et al., 1993). Il va sans dire que le tacrolimus partage également les mêmes effets indésirables généraux de la cyclosporine. Tout comme la cyclosporine, le tacrolimus exerce des effets inhibiteurs puissants sur l'activation du lymphocyte T et la transcription des gènes des cytokines incluant l'IL-2. Par contre, le tacrolimus se lie spécifiquement à un groupement de protéines de liaison issu de la famille des immunophilines, le FKBP-12 (*FK506 binding proteins-12*), qui est présent de manière ubiquitaire dans le cytoplasme, et qui fonctionne comme une isomérase cis/trans peptidyl/prolyl, tout comme la cyclophiline (Liu et al., 1991). Le complexe tacrolimus/FKBP-12 va ensuite se lier à la calcineurine, inhiber son activité enzymatique, et occasionner des réponses inhibitrices au niveau de la transcription des gènes, similaires à la cyclosporine, telles que décrites ultérieurement (Figure 1.6.2). C'est l'inhibition de la calcineurine qui confère au tacrolimus ses propriétés immunosuppressives puisqu'une simple altération de l'activité isomérase cis/trans peptidyl/prolyl du FKBP-12 n'est pas suffisante pour causer des effets antiproliférateurs (Bierer et al., 1990). Au niveaux des concentrations, le tacrolimus a été démontré à être de dix à 100 fois plus puissant que la cyclosporine dans des études de prolifération cellulaire (Morris, 1996; Thomson et al., 1995). Cependant, en clinique, pour des doses utilisées de tacrolimus et de cyclosporine procurant une intensité équivalente d'inhibition de la calcineurine, le tacrolimus semble être d'égale puissance à la cyclosporine. Ceci suggère que le tacrolimus possède une plus grande affinité à se lier au FKBP-12 que la cyclosporine à lier la cyclophiline (Miller, 2001). De manière similaire à la cyclosporine, le tacrolimus inhibe la transcription des gènes des cytokines nécessaires à l'activation du lymphocyte T tels l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, l'IFN- γ , le facteur de stimulation du macrophage et du granulocyte et le TNF- α , et les proto-oncogènes ras,

myc et rel (Morris, 1996; Thomson et al., 1995). Le tacrolimus inhibe préférentiellement les cytokines produites par les lymphocytes T auxiliaires de type 1 ou Th1 (par exemple, l'IL-2, le TNF- α et l'IFN- γ) par rapport aux cytokines produites par des lymphocytes T auxiliaires de type 2 ou Th2 (par exemple, l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10), qui sont plus impliquées dans l'activation du lymphocyte B et la production d'anticorps) (Thomson et al., 1995). Cependant, il a été rapporté dans des études *in vitro* que le tacrolimus inhibe l'activation des lymphocytes B et la production d'anticorps via le blocage des réponses du lymphocyte T (Peters et al., 1993). Manez et al. (1995) ont d'ailleurs démontré que le tacrolimus cause un effet direct sur les lymphocytes B en bloquant la division cellulaire à la fin de la phase G₁ et ainsi inhiber la prolifération des lymphocytes B, lorsqu'il est ajouté à la culture cellulaire aussi tard que 24 heures après une stimulation antigénique. De plus, des études *in vitro* effectuées par Hendey et al. (1992) ont démontré que le tacrolimus peut inhiber la migration des neutrophiles. Un autre effet immunosuppresseur produit par le tacrolimus consiste en l'inhibition de la production d'oxyde nitrique (Langrehr et al., 1992). En effet, Devlin et al. (1994) ont rapporté l'importance de la voie de biosynthèse de l'oxyde nitrique/L-arginine dans la réponse allogénique. De plus, les auteurs ont démontré que les patients traités au tacrolimus possédaient des taux plasmatiques d'oxyde nitrique inférieurs à ceux des patients traités à la cyclosporine. Tout comme la cyclosporine, le tacrolimus cause la production de la cytokine immunosuppressive et fibrogénique TGF- β dans des cellules mammaliennes (Khanna et al., 1999). Malgré que la cyclosporine et le tacrolimus soient des molécules sœurs qui partagent plusieurs propriétés similaires, il a été rapporté que le tacrolimus inhibe la production d'IL-10 de manière plus importante que ne le fait la cyclosporine (Jiang et al. 1999). De plus, il a été rapporté qu'un traitement au tacrolimus permet de supprimer de manière plus importante l'expression des molécules d'adhésion et de costimulation, des réponses de type Th1 et l'activité des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires comparativement à un traitement à la cyclosporine chez des patients transplantés rénaux (Plosker et al., 2000).

Études précliniques. Les effets immunosuppresseurs du tacrolimus ont été démontrés dans plusieurs modèles animaux. En effet, les premières évaluations *in vivo* ont été effectuées dans un modèle de transplantation rénale chez le chien (Todo et al., 1987). Les auteurs ont démontré l'efficacité du tacrolimus à augmenter la survie des allogreffes rénales. L'effet immunosuppresseur du tacrolimus a également été évalué dans des modèles de transplantation rénale, hépatique et pancréaticoduodénale chez les primates non humains (Calne et al., 1987; Monden et al., 1990; Ericzon et al., 1990). Makowka et al. (1987) ont également rapporté que le tacrolimus prévient le rejet hyperaigu chez des rats présensibilisés. De plus, Todo et al. (1989) ont démontré qu'un traitement au tacrolimus permet de prolonger de manière significative la survie des allogreffes rénales chez des babouins non apparentés. Des études effectuées chez le rat ont démontré que le tacrolimus prévient et renverse le rejet aigu en plus de causer une survie indéfinie d'allogreffe dans un modèle de transplantation de membre inférieur (Arai et al., 1989). De plus, Hoffman et al. (1990) ont rapporté que le tacrolimus inhibe le rejet aigu et prévient contre la maladie de la greffe contre l'hôte dans un modèle de transplantation intestinale chez le rat. Les premières évaluations du tacrolimus à inhiber le rejet aigu d'allogreffe cardiaque ont été effectuées par Murase et al. (1990a; 1990b). Les auteurs (1993) ont également rapporté que le tacrolimus, combiné à des inhibiteurs de nucléotides, permet de prolonger la survie des xénogreffes cardiaques et hépatiques dans un modèle de transplantation de hamster à rat. Kawauchi et al. (1993) ont également démontré que la combinaison du tacrolimus et du methotrexate prolonge de manière significative la survie des xénogreffes cardiaques dans un modèle de transplantation de singes rhésus à babouins. Plus récemment, Asano et al. (2003) rapportent dans le même modèle de xénotransplantation que le tacrolimus combiné au methotrexate et à la globuline antilymphocytaire permet de prolonger la survie des allogreffes cardiaques jusqu'à 300 jours posttransplantation. Par contre, puisque l'immunité humorale joue un rôle important dans la pathogenèse du rejet de xénogreffe et que le tacrolimus joue un rôle secondaire dans l'inhibition des lymphocytes B et la production des anticorps allospécifiques, il est probable que l'effet

anti-rejet de xénogreffe soit plutôt être associé aux antimétabolites qu'au tacrolimus en tant que tel.

Considérations cliniques. 1) Aspects pharmacocinétiques: Le tacrolimus possède les caractéristiques pharmacocinétiques suivantes: i) Il est très lipophile, et donc il est commercialisé sous une formulation émulsive (Prograf®); ii) Il possède une absorption variable et incomplète, et une faible biodisponibilité (20-25%) suite à une administration orale; iii) Son absorption est indépendante de la sécrétion biliaire, facilitant l'élaboration de protocoles d'immunosuppression chez les patients transplantés hépatiques; iv) Son absorption est affectée par la prise de nourriture; v) Il est hautement lié aux protéines plasmatiques, principalement l'albumine et la α_1 -glycoprotéine, et aux érythrocytes; vi) Il est majoritairement métabolisé par le CYP3A4, et il produit plus de 15 métabolites. Tout comme la cyclosporine, une attention particulière doit être prise pour éviter les interactions médicamenteuses; vii) Il est généralement éliminé par la voie biliaire, et moins de 1% de la dose de tacrolimus est excrétée sous forme inchangée; viii) Il semble avoir un patron de distribution tissulaire précis suite à une administration intraveineuse: poumons (jusqu'à 800% comparativement au plasma) → rate → cœur → rein → pancréas → foie (équivalente au plasma) (Miller, 2001; MacDonald, 2001; Plosker et al., 2000). 2) Études cliniques: Le tacrolimus possède un historique clinique unique puisqu'il a d'abord été évalué chez des patients transplantés hépatiques plutôt que chez des patients transplantés rénaux. Le tacrolimus a obtenu l'approbation du FDA pour son utilisation en transplantation hépatique. L'efficacité immunosuppressive du tacrolimus a également été évaluée dans des études cliniques en transplantation rénale, cardiaque, pulmonaire, pancréatique et intestinale (MacDonald, 2001). Depuis son introduction en clinique, il s'est effectué des études cliniques multicentriques aux États-Unis et en Europe, comparant l'efficacité et le profil de toxicité du tacrolimus en émulsion (Prograf®) à ceux de la cyclosporine (majoritairement avec la formulation Sandimmune®) chez des patients transplantés rénaux, hépatiques, cardiaques, pulmonaires et pancréatiques. En général, le tacrolimus

est au moins aussi efficace, voire même supérieur (en transplantation hépatique et rénale) que la cyclosporine à prévenir contre les épisodes de rejet aigu chez des patients transplantés. Du côté des effets secondaires, les deux plus grands avantages à utiliser le tacrolimus demeurent son bon profil cardiovasculaire (diminution de l'hypertension et de l'hyperlipidémie) et une diminution du besoin de stéroïdes. De plus, puisque l'aspect cardiovasculaire est favorable, l'incidence du rejet chronique est également diminuée chez les patients transplantés hépatiques, traités avec le tacrolimus. Cependant, comparativement à la cyclosporine, le tacrolimus cause une plus importante neurotoxicité (migraine et tremblements) et une plus grande incidence au diabète. En outre, une étude multicentrique européenne rapporte que la néphrotoxicité induite est plus importante chez des patients transplantés hépatiques traités avec le tacrolimus que ceux traités avec la cyclosporine. Néanmoins, aucune différence significative n'a été observée dans les études multicentriques en transplantation rénale et cardiaque. Du côté des infections opportunistes, aucune différence n'a été observée entre ces deux inhibiteurs de la calcineurine (Miller, 2001). Tout récemment, des études cliniques évaluant le tacrolimus et la cyclosporine en émulsion (Neoral®) ont rapporté que le tacrolimus est plus efficace à prévenir contre le rejet aigu (prolongation de la survie des patients et des allogreffes) chez des patients transplantés rénaux et hépatiques, tout en réduisant l'hypertension et l'hypercholestérolémie (O'Grady et al., 2000; Trompeter et al., 2002; Boots et al., 2001). Cependant, une étude clinique menée par Abouljoud et al. (2002) rapporte que la cyclosporine en émulsion représente une alternative efficace et sécuritaire pour les patients intolérants au tacrolimus.

Effets secondaires et toxicités. Puisque le tacrolimus est un inhibiteur de la calcineurine, ses effets secondaires sont grandement similaires à ceux de la cyclosporine. Par contre, le tacrolimus est plus neurotoxique que la cyclosporine. Il a été démontré qu'une déficience en magnésium est un facteur pathogénique de la neurotoxicité (Al Khursany et al., 1992). En effet, une hypomagnésémie entraîne des convulsions résultant d'une stimulation excessive des nerfs et une augmentation des

contractions musculaires. Le tacrolimus et la cyclosporine ont tous deux été rapportés à causer une hypomagnésémie chez les patients transplantés. En outre, il a été rapporté que le tacrolimus et la cyclosporine réduisent l'activité de la pompe sodium/potassium ATPase dans les cellules tubulaires rénales par l'inhibition de la calcineurine (Lea et al., 1994). Il s'ensuit donc d'une diminution du magnésium dans les tubules rénaux, puisque la pompe sodium/potassium ATPase est impliquée dans la réabsorption par transport actif du magnésium dans le rein. Outre la neurotoxicité, le tacrolimus cause habituellement une plus grande incidence de diabète que la cyclosporine. Il a été rapporté que les facteurs causant le diabète chez les patients transplantés traités avec le tacrolimus ou la cyclosporine sont multiples, et ils impliquent une diminution de la sécrétion d'insuline, une augmentation de la résistance à l'insuline, et un effet toxique direct sur les cellules bêta pancréatiques (Jindal et al., 1997). Cependant, il semble que le tacrolimus possède un meilleur profil cardiovasculaire comparativement à la cyclosporine.

Sirolimus

Le sirolimus (rapamycine, Rapamune®) est un macrolide issu de la fermentation naturelle du *Streptomyces hygroscopicus*, un actinomycète isolé pour la première fois en 1968 par des chercheurs canadiens, sur l'île de Pâques (Rapa Nui). Ce n'est qu'en 1975 que la molécule fut développée pour ses propriétés antifongiques et antibiotiques par l'équipe du Docteur Sehgal, dans les laboratoires de Ayerst à Montréal (Vézina et al., 1975; Sehgal et al., 1975). La structure chimique du sirolimus (0.914 kD) est étonnement similaire à celle du tacrolimus, et les deux molécules se lient à la même protéine de liaison de la famille des immunophilines, le FKBP-12 (Figure 1.6.1). Cependant, le mécanisme d'action du sirolimus est fort distinct de celui du tacrolimus ou de la cyclosporine, voire même unique, faisant du sirolimus un immunosuppresseur particulier et très prometteur.

Propriétés immunosuppressives: mécanisme d'action moléculaire et cellulaire.

Tout comme les autres molécules non-biologiques qui se lient aux immunophilines, le sirolimus traverse librement la membrane cellulaire. Une fois dans le cytoplasme, le sirolimus se lie au FKBP-12 pour former le complexe sirolimus/FKBP-12 (Koser et al., 1993). Contrairement au tacrolimus, le sirolimus ne bloque pas l'activité phosphatase de la calcineurine, et par conséquent il n'inhibe pas la transcription des cytokines impliquées dans l'activation du lymphocyte T. Le complexe sirolimus/FKBP-12 se lie plutôt à une protéine multifonctionnelle appelé mTOR (*mammalian target of rapamycin*) (Sabers et al., 1995). La protéine mTOR possède une activité kinase qui joue un rôle central dans la voie de signalisation par laquelle les récepteurs des facteurs de croissance (par exemple, l'IL-2R) contrôlent le cycle cellulaire (Figure 1.6.3). Les cytokines (par exemple, l'IL-2) et facteurs de croissance, produits suite à une reconnaissance allogénique, se lient à leurs récepteurs respectifs en surface cellulaire et activent l'enzyme IP_3 , qui à son tour va activer la protéine kinase B (aussi appelé Akt), une sérine/thréonine kinase qui a été démontrée à être activée par des stimuli tels que l'insuline et les facteurs de croissance PDGF, EGF et bFGF (Burgering et al., 1995). Ceci active la kinase mTOR qui est associée à la protéine phosphatase 2A, et qui en contrôle son activité (Peterson et al., 1999). De manière directe ou indirecte (via la phosphatase 2A), mTOR contrôle l'état de phosphorylation et l'activité des protéines 4E-BP1 et p70S6 kinase (Hara et al., 1998). La protéine 4E-BP1 contrôle l'assemblage des facteurs responsables de l'élongation et de l'initiation de la translation, tandis que la p70S6 kinase contrôle l'activité des ribosomes. Par conséquent, mTOR contrôle la progression de la phase G_1 à la phase S du cycle cellulaire. Le complexe sirolimus/FKBP-12 se lie à mTOR, inhibe son activité kinase et bloque la voie de signalisation de mTOR. Or, le sirolimus prévient l'activation de la translation et de la protéine ribosomale S6, et bloque ainsi le cycle cellulaire à la fin de la phase G_1 -S (Terada et al., 1993). La protéine mTOR est une molécule multifonctionnelle qui influence plusieurs autres voies de signalisation intracellulaire (non illustrée dans la Figure 1.6.3). Par exemple, lorsque l'IL-2 se lie à son récepteur IL-2R, il s'ensuit une cascade d'événements qui résulte en la

transcription de plusieurs protéines régulatrices du cycle cellulaire. L'activité de ces protéines peut être modulée par le sirolimus. Il en résulte de l'inhibition de l'activité kinase du p34cdc2, la production de cycline A, l'activité de p33cdk2 et l'association cycline D1/cdk (Morice et al., 1993). Le sirolimus semble aussi réduire l'activité et la phosphorylation des cyclines D3, E, et A, des enzymes dont l'activité est augmentée durant la phase G₁ (Decker et al., 2003). De plus, lors d'une stimulation antigénique impliquant le CD28, la voie de l'IkB α peut être activée et cela résulte en une augmentation de la transcription des gènes des cytokines. Contrairement à la cyclosporine, le sirolimus possède la propriété d'inhiber la sous-régulation du facteur IkB α . Il s'ensuit donc d'une inhibition de la translocation vers le noyau du facteur de liaison de l'élément de réponse du CD28, c-rel, et donc l'expression du gène de l'IL-2 est diminuée (Lai, 1994). Le sirolimus agit principalement en inhibant la prolifération cellulaire et le signal des cytokines, mais il n'a que très peu d'effet sur la production des cytokines (Sehgal et al., 1995). Par exemple, le sirolimus bloque le signal d'une variété de cytokines tels l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-6, l'IL-12, le facteur de croissance de l'insuline, le bFGF et le PDGF (Sehgal et al., 1994; Wood et al., 1994; Bertagnolli et al., 1994). En effet, le sirolimus bloque la progression cellulaire initiée par les cytokines via l'inhibition de mTOR ainsi que les voies de signalisation sous-jacentes comme le p70^{s6k} et la cdk-cycline. En outre, le sirolimus inhibe la prolifération lymphocytaire induite par des stimuli qui empruntent des voies calcium-dépendantes et calcium-indépendantes (Sehgal et al., 1994; Wood et al., 1994). Il a été démontré que le sirolimus inhibe la prolifération des lymphocytes B dépendante ou indépendante de l'IL-2 (par exemple, l'IL-6), résultant en une diminution de la production d'anticorps IgM, IgG et IgA (Luo et al., 1992; Chen et al., 1993; Aagaard-Tillery et al., 1994; Kim et al., 1994). Néanmoins, l'activité antiprolifératrice du sirolimus n'est pas seulement limitée aux cellules normales du système immunitaire. Il inhibe aussi la prolifération de plusieurs types de lignées cellulaires tumorales (hépatiques, rénales, ostéoblastiques, myogéniques, mélanocytiques, nerveuses), y compris des lignées humaines de lymphocytes T et B, en plus d'induire l'apoptose chez certaines cellules tumorales (Molnar-Kimber et al., 1994;

Shi et al., 1995). Wieder et al. (1993) ont d'ailleurs démontré qu'un traitement de sirolimus permet réduire l'expression de MIP-2, de granzyme B et d'IFN- γ dans les allogreffes cardiaques chez le rat. En outre, il a été rapporté que le sirolimus inhibe la prolifération des cellules musculaires lisses, suite à une stimulation avec les facteurs de croissance bFGF et PDGF (Cao et al., 1995; Marx et al., 1995). Dans une étude menée par Dodge et al. (2000), les auteurs démontrent que le sirolimus induit la production du TGF- β chez les lymphocytes T, et ils suggèrent que les mécanismes immunosuppresseurs du sirolimus puissent impliquer la production de ce facteur de croissance. Cependant, contrairement aux inhibiteurs de la calcineurine, le sirolimus n'inhibe pas la production des cytokines impliquées dans l'activation du lymphocyte T. Certains croyaient à l'époque que l'incapacité du sirolimus à bloquer la production de l'IL-2 représentait un point faible de ce nouvel agent. Or, il a été démontré par Li et al. (1998) que des souris double *knock-out* des gènes de l'IL-2 et l'IL-4 peuvent rejeter des allogreffes d'îlots pancréatiques, et qu'un traitement au sirolimus peut prévenir le rejet aigu indépendant de l'IL-2 et l'IL-4. De plus, les auteurs rapportent que le sirolimus possède la capacité d'induire la tolérance chez les receveurs transplantés puisque l'IL-2 semble essentielle dans les mécanismes d'induction de la tolérance, et le sirolimus n'en bloque pas sa production, contrairement à la cyclosporine ou au tacrolimus. Le sirolimus représente un agent immunosuppresseur très potentiel, voire intéressant d'inclure dans des protocoles d'immunosuppression puisque ses mécanismes d'action sont uniques et qu'ils diffèrent de ceux des inhibiteurs de la calcineurine.

Études précliniques. Les effets *in vivo* du sirolimus ont été évalués de manière exhaustive dans des modèles animaux par l'équipe de transplantation à l'hôpital Notre-Dame, à Montréal. Les auteurs ont démontré qu'un traitement au sirolimus, même sur une courte période, permet de prolonger la survie des allogreffes vascularisées cardiaques, rénales, pancréatiques et intestinales chez les rongeurs et les primates non humains, et que la survie des allogreffes à long terme induite par le sirolimus est dépendante de la persistance de l'alloantigène (Chen et al., 1992a; 1992b; 1992c; 1993,

1994). Collier et al. (1990) ont rapporté l'effet immunosuppresseur du sirolimus à prévenir contre le rejet d'allogreffes rénales chez le chien et le porc. Stepkowski et al. (1991) ont également démontré que le sirolimus est un immunosuppresseur puissant dans des modèles de transplantations vascularisées cardiaques, rénales et intestinales chez le rat. Il a également été démontré que le sirolimus inhibe la maladie de la greffe contre l'hôte chez le rat (Stepkowski et al., 1992). Le sirolimus a aussi été évalué dans des modèles de transplantations rénales chez le porc (Almond et al., 1993). Enfin, l'effet du sirolimus a également été démontré à prévenir contre le rejet accéléré, la maladie de la greffe contre l'hôte, et le rejet de xénogreffe (Schmidbauer et al., 1994; Blazar et al., 1993; Lu et al., 1994).

Considérations cliniques. 1) Aspects pharmacocinétiques: Les caractéristiques pharmacocinétiques du sirolimus incluent i) une grande liposolubilité, suggérant qu'une diète riche en lipides puisse faciliter l'absorption du sirolimus; ii) une faible biodisponibilité suite à une ingestion orale; iii) une grande variabilité intra- et interindividuelle; iv) une demi-vie d'élimination très longue de 62.3 ± 16.2 heures, suggérant qu'une administration simple quotidienne soit requise pour une thérapie de maintien, mais qu'une thérapie d'induction initiale requiert une administration simple d'une dose équivalente à trois fois la dose de maintien; v) un métabolisme majoritairement hépatique via le CYP3A4 et un métabolisme intestinal (environ 14%) via le contre-transporteur p-glycoprotéine, produisant plus de sept métabolites différents (Paine et al., 2002). Ceci explique la faible biodisponibilité du sirolimus suite à une ingestion orale. Puisque le sirolimus est majoritairement métabolisé par le CYP3A4, il va sans dire qu'une attention particulière se doit d'être prise pour éviter les interactions médicamenteuses. En effet, il a été démontré qu'il existe une interaction pharmacocinétique entre le sirolimus et le diltiazem (Bottiger et al., 2001). Ironiquement, le tacrolimus et la cyclosporine sont également métabolisés par le CYP3A4, suggérant que des vigilances doivent être apportées lors de l'élaboration de protocoles d'immunosuppression incluant ces immunosuppresseurs. Le profil

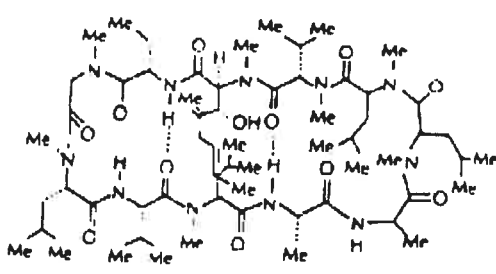
pharmacocinétique du sirolimus peut être problématique puisqu'il possède une très longue demi-vie et une grande variabilité intra- et interpersonnelle quant à sa biodisponibilité, rendant le monitoring de l'agent difficile chez des patients transplantés. Or, un dérivé analogue du sirolimus, le SDZ-RAD (Everolimus®), a été conçu pour contrer les problèmes pharmacocinétiques du sirolimus. Des études cliniques initiales rapportent que le SDZ-RAD, en combinaison avec la cyclosporine et la prednisone réduit l'incidence de rejet aigu chez des patients transplantés rénaux (Kahan et al., 2001).

2) Études cliniques: Les résultats de la première étude clinique de phase III, randomisée, contrôlée, et menée à l'échelle internationale par le *RAPAMUNE Global Study Group* démontrent que le sirolimus combiné à la cyclosporine et aux corticostéroïdes réduit de manière significative l'incidence des épisodes de rejet aigu chez des patients transplantés rénaux ayant reçu une allogreffe histoincompatible, et sans toutefois augmenter les risques d'infections opportunistes et de tumeurs malignes reliées à la prise d'immunosuppresseurs, à six et 12 mois posttransplantation (MacDonald, 2001). Néanmoins, puisque le sirolimus, la cyclosporine et le tacrolimus sont tous métabolisés par le CYP3A4, des risques d'interactions médicamenteuses représentent une problématique quant au bon monitoring des agents. De plus, il semble que le sirolimus empire les effets fibrogéniques des inhibiteurs de la calcineurine. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que, tout comme la cyclosporine ou le tacrolimus, le sirolimus induit la production de TGF- β chez les lymphocytes T (Dodge et al., 1999). Depuis, plusieurs centres ont débuté des études évaluant le sirolimus dans des protocoles d'immunosuppression exempts d'inhibiteurs de la calcineurine. Récemment, une étude multicentrique de phase II, randomisée, contrôlée, et regroupant plus de 17 centres à travers les États-Unis et l'Europe rapporte qu'un retrait précoce de la cyclosporine, initialement combinée avec le sirolimus, est sécuritaire et permet même une amélioration de la fonction rénale chez des patients transplantés rénaux. L'utilisation réduite de la cyclosporine n'augmente pas de façon significative l'incidence de rejet aigu chez les patients caucasiens et de race noire (Gonwa et al., 2002). En outre, les résultats d'une étude prospective, randomisée, et menée par une équipe de

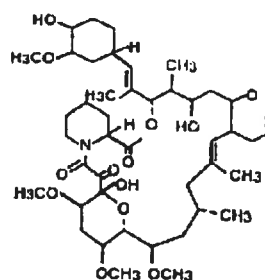
Cleveland rapportent qu'un protocole d'immunosuppression sans inhibiteurs de la calcineurine, c'est-à-dire incluant le basiliximab en thérapie d'induction, le sirolimus et le mycophénolate mofétil, permet d'améliorer significativement la fonction rénale des patients transplantés rénaux, à 12 mois posttransplantation (Flechner et al., 2002). De plus, une étude clinique évaluant la thérapie combinée du sirolimus et d'une thérapie d'induction à la globuline antithymocyte de lapin révèle que cette approche thérapeutique est bien tolérée, et qu'aucun patient transplanté n'a eu recours aux inhibiteurs de la calcineurine puisqu'ils démontraient une excellente fonction rénale (Swanson et al., 2002).

Effets secondaires et toxicités. Les toxicités les plus inquiétantes causées par le sirolimus sont l'hyperlipidémie, la thrombocytopénie, la leucopénie et l'anémie (Whiting et al., 1991; Meier-Kriesche et al., 2000; Hong et al., 2000). En outre, le sirolimus cause d'autres effets indésirables comme des ulcères buccaux et l'altération dans le processus de remodelage tissulaire (van Gelder et al., 2003; Romero et al., 1995). Contrairement aux inhibiteurs de la calcineurine, le sirolimus n'est pas néphrotoxique, mais il a été rapporté à augmenter de manière synergique la néphrotoxicité induite par la cyclosporine (Di Joseph et al., 1993; Andoh et al. 1996). Il semble que la thérapie combinée du sirolimus et de la cyclosporine n'est pas aussi séduisante qu'on l'avait imaginée. Il serait donc plus vigilant d'apporter une attention particulière sur les interactions médicamenteuses au niveau pharmacocinétique et les effets néphrotoxiques que peut occasionner la thérapie combinée du tacrolimus et du sirolimus. Récemment, McAlister et al. (2002) ont démontré, dans une étude clinique de pharmacocinétique, qu'une thérapie combinée du sirolimus et du tacrolimus n'augmentent pas l'incidence de thrombocytopénie, de néphrotoxicité, ni d'autres toxicités chez des patients transplantés hépatiques et rénaux. Les résultats de cette étude confirment qu'un dosage simultané du tacrolimus et du sirolimus en posttransplantation est sécuritaire et qu'un monitoring des concentrations plasmatiques des agents est adéquat pour contrôler le traitement.

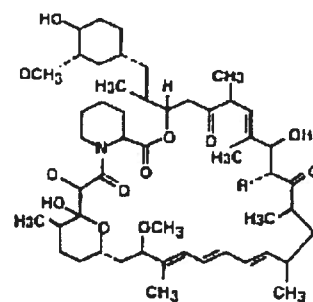
FIGURE 1.6.1. Structure chimique de la cyclosporine, du tacrolimus, et du sirolimus



Cyclosporine
(1.202 kD)

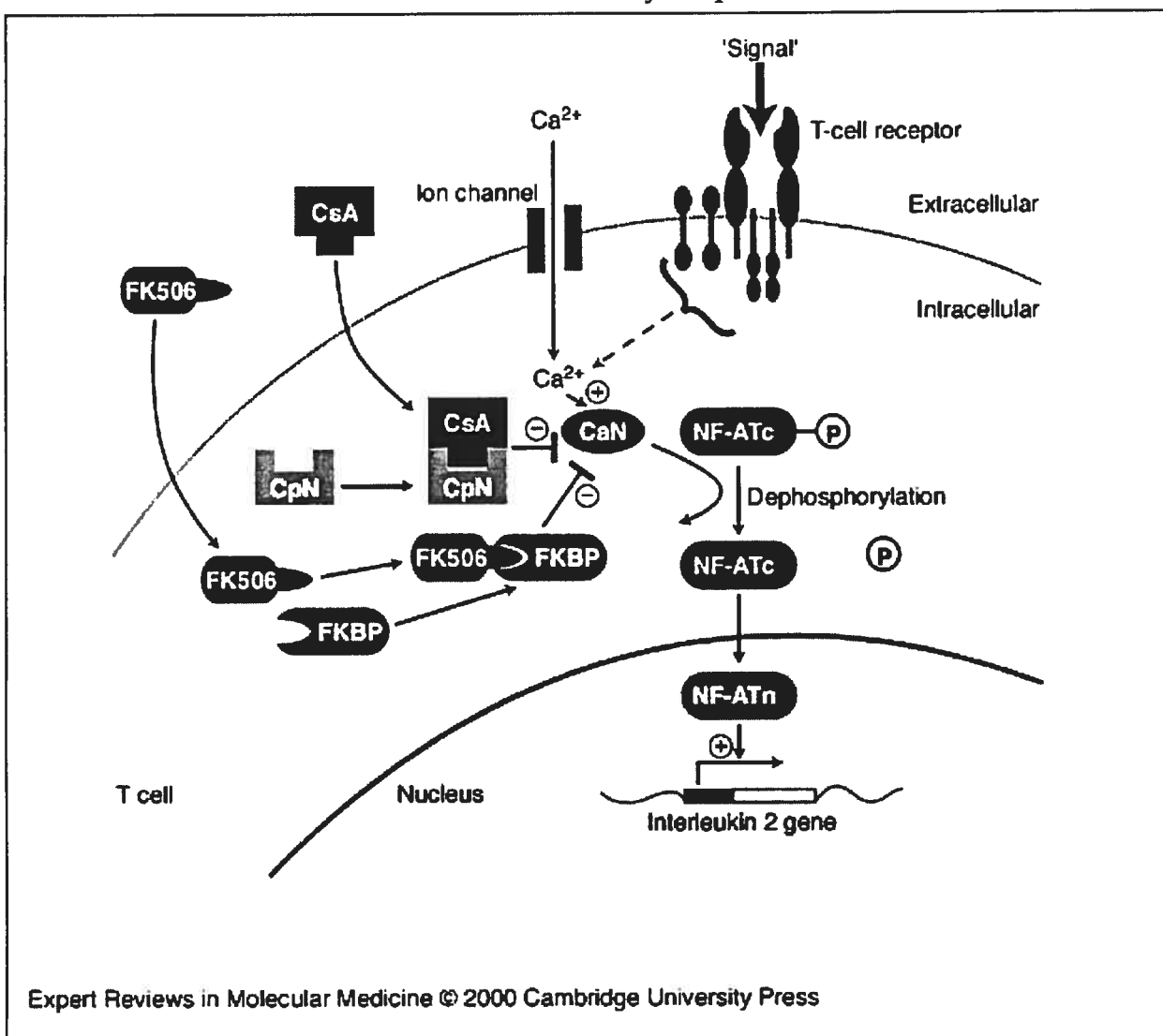


Tacrolimus
(0.822 kD)



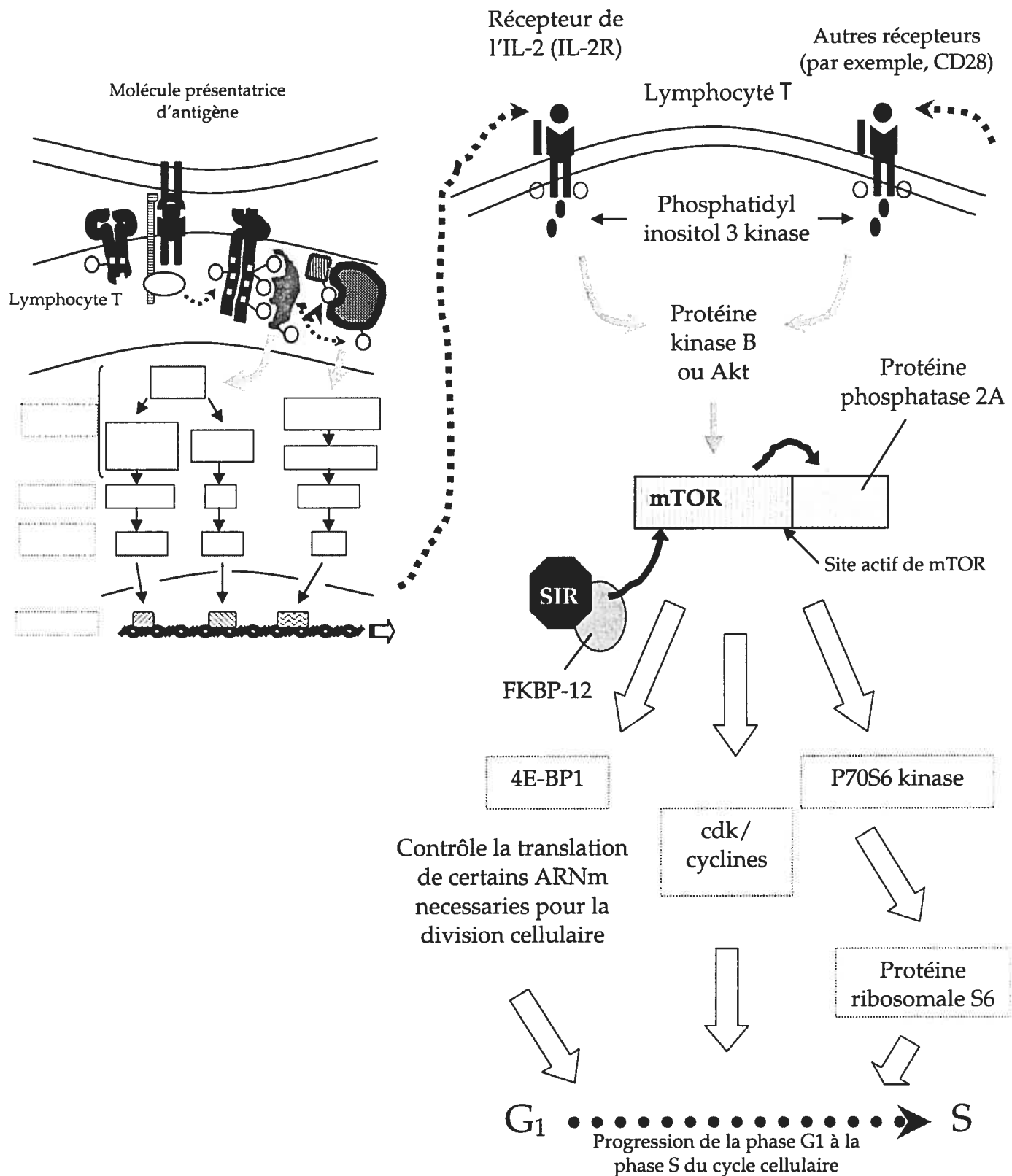
Sirolimus
(0.914 kD)

FIGURE 1.6.2. Mécanisme d'action de la cyclosporine et du tacrolimus



CaN, calcineurine; CpN, cyclophiline; CsA, cyclosporine; FK506, tacrolimus; FKBP, FK506 binding proteins; NF-ATc; nuclear factor of activated T cell (cytosolic); NF-ATn; nuclear factor of activated T cell (nuclear).

FIGURE 1.6.3. Mécanisme d'action du sirolimus



Adapté de Abbas, 2000; Halloran, 2001.

1.7 LES INHIBITEURS DE LA SYNTHÈSE DE NUCLÉOTIDES

Mycophénolate mofétil

Propriétés immunosuppressives: mécanisme d'action moléculaire et cellulaire.

Le mycophénolate mofétil (Cellcept®) est un dérivé semi-synthétique de l'acide mycophénolique, un produit naturel issu de la fermentation de *Penicillium glaucum* (Williams et al., 1968a). L'acide mycophénolique a été isolé pour la première fois en 1969 pour ses propriétés antivirales et antitumorales (Williams et al., 1969b; Ando et al., 1968; Suzuki et al., 1969). Plus tard, il a été démontré à être un puissant agent inhibiteur de la synthèse d'ADN chez les lymphocytes en bloquant la synthèse du nucléotide guanine dans des cellules tumorales (Franklin et al., 1969; 1971; Cline et al., 1969). Durant les années 70, l'acide mycophénolique est devenu l'agent immunosuppresseur par excellence pour traiter les patients atteints de psoriasis (Jones et al., 1975; Van Scott, 1976). Au début des années 90, le mycophénolate mofétil a été développé pour accroître la biodisponibilité de l'acide mycophénolique, en ajoutant un groupement mofétil à sa structure chimique (Figure 1.7.1) (Platz et al., 1991). Le mycophénolate mofétil est un agent à faible poids moléculaire (0.4335 kD) dont le nom chimique et la formule empirique sont 2-morpholinoethyl(E)-6-(1,3-dihydro-4-hydroxy-6-methoxy-7-methyl-3-oxo-5-isobenzofuranyl)-4-methyl-4-hexenoate et $C_{23}H_{31}NO_7$, respectivement (Fulton et al., 1996). En outre, le mycophénolate mofétil a également été développé dans le but d'avoir recours à un nouvel agent immunosuppresseur causant moins d'effets cytotoxiques sur les cellules non immunitaires. Morris et al. (1990) a d'ailleurs démontré que le mycophénolate mofétil (anciennement connu sous le nom RS-61443) prévient le rejet d'allogreffe cardiaque en inhibant de manière sélective la synthèse des purines chez les lymphocytes T et B. Le mécanisme du mycophénolate mofétil est basé sur le principe qu'une altération de la voie *de novo* de la biosynthèse des purines crée une immunodéficiencia sans toutefois affecter les autres types cellulaires. En effet, la biosynthèse des purines chez les lymphocytes se fait seulement par la voie *de novo* tandis que les autres types cellulaires ont recours à la voie de récupération (Allison et

al., 1975). Le mycophénolate mofétil inhibe la synthèse des purines en bloquant l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH), une enzyme clé de la voie *de novo* (Figure 1.7.2) (Ramson, 1995; Page et al, 1987). Cependant, le mycophénolate mofétil est un inhibiteur non-compétitif puisqu'il n'agit pas comme un analogue des purines, et n'entre donc pas en compétition avec l'inosine monophosphate. L'IMPDH convertit l'inosine monophosphate en xanthosine 5'-monophosphate, lequel est l'enzyme clé dans l'étape limitante de la synthèse *de novo* de la guanosine monophosphate (Ramson, 1995; Allison et al., 2000). En effet, en absence d'une IMPDH fonctionnelle, la voie *de novo* produit un excès en adénosine monophosphate. Or, un déséquilibre dans les niveaux de guanosine monophosphate et d'adénosine monophosphate déclenche une interruption de l'activité des enzymes essentiels en aval de la voie de biosynthèse des purines. La synthèse de guanosine monophosphate est donc essentielle dans la biosynthèse des purines. La voie *de novo* est spécifiquement requise pour la prolifération des lymphocytes T et B, mais pas pour d'autres types de cellules. Le mycophénolate mofétil inhibe probablement l'IMPDH dans les cellules d'autres types, mais ces dernières peuvent recourir à la voie de récupération, laquelle les lymphocytes ne possèdent pas (Allison et al., 2000). Dans un sens, le mycophénolate mofétil est un inhibiteur spécifique de la prolifération des lymphocytes puisque leur synthèse en purines dépend uniquement de la voie *de novo*. La prolifération d'autres types de cellules n'est pas bloquée puisque que ces dernières ont recours à la voie de récupération de la synthèse des purines. Ceci explique en grande partie pourquoi le mycophénolate mofétil est beaucoup moins toxique et mieux toléré que l'azathioprine, puisque ce dernier inhibe la synthèse d'ADN de manière non sélective. En plus de posséder moins d'effets secondaires, il a été démontré que le mycophénolate mofétil est plus efficace que l'azathioprine à prévenir le rejet aigu d'allogreffe chez des patients transplantés cardiaques (Ensley et al., 1993). Or, il arrive que l'azathioprine soit substitué par le mycophénolate mofétil en clinique.

Évaluations précliniques. Le mycophénolate mofétil est un des rares agents immunosuppresseurs à être testé en clinique sans avoir été évalué de manière exhaustive en phase préclinique. Les évaluations précliniques du mycophénolate mofétil ont été effectuées majoritairement par Eugui, Allison, Morris et Sollinger. En effet, Hao et al. (1990) ont démontré que le mycophénolate mofétil permet de prolonger de manière significative la survie d'îlots pancréatiques allogéniques chez la souris. L'effet immunosuppresseur du mycophénolate mofétil a également été évalué dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat et le primate non humain (Morris et al., 1990; 1991). Dans une élégante étude, Platz et al. (1991) ont rapporté que le mycophénolate mofétil permet de prolonger de façon significative la survie des allogreffes rénales chez le chien et qu'un tel traitement ne cause pas d'infections virales ou bactériennes, ni de néphrotoxicité. Dans des études *in vitro*, il a été démontré que le mycophénolate mofétil inhibe la prolifération des lymphocytes B humains et la production d'anticorps IgG (Grailer et al., 1991; Burlingham et al., 1991). En plus de causer des effets immunosuppresseurs, Allison et al. (1991) ont rapporté que le mycophénolate mofétil produit des effets antiinflammatoires. Puisque que le mycophénolate mofétil inhibe la réponse humorale, son effet a également été évalué à prévenir et traiter contre le rejet de xénogreffe et le rejet chronique (Wang et al., 1991; Murase et al., 1993; Figueroa et al., 1993; Roberts et al., 1993; O'Hair et al., 1994; Azuma et al., 1995; Joli cœur et al., 2003). Peu de temps après son développement, le mycophénolate mofétil a été introduit en clinique. Sollinger et al. (1992) ont été les premiers à rapporter des données cliniques de phase I. Les auteurs ont démontré qu'un traitement au mycophénolate mofétil permet de prolonger significativement la survie des allogreffes rénales de donneurs cadavériques sans toutefois causer d'infections opportunistes, de néphrotoxicité ou d'hépatotoxicité. D'autres études cliniques ont été initiées afin d'évaluer l'effet de cet inhibiteur d'acides nucléiques chez des patients transplantés rénaux, hépatiques et cardiaques (Klintmalm et al., 1993; Deierhoi et al., 1993; Kirklin et al., 1994).

Considérations cliniques. 1) Aspects pharmacocinétiques: Le mycophénolate mofétil possède une grande biodisponibilité, et donc son absorption est complète suite à une ingestion orale. Aucun monitoring n'est alors nécessaire. Après administration orale, il est rapidement converti en son métabolite actif, l'acide mycophénolique, sous l'action des estérases (Figure 1.7.1) (Fulton et al., 1996). En général, il n'existe pas de grandes variations intra- et interpersonnelles puisque que l'aire sous la courbe concentration *versus* temps est habituellement proportionnelle au dosage (Bullingham et al., 1996). Cependant, le mycophénolate mofétil est hautement lié à des protéines plasmatiques. Le mycophénolate mofétil est métabolisé par le glucuronosyl transférase sous la forme inactive de l'acide mycophénolique glucuronique. Ce dernier est majoritairement éliminé par la voie urinaire (87%), mais aussi par la voie fécale et biliaire (via la circulation entérohépatique) (Fulton et al., 1996). Cependant, le mécanisme expliquant la grande capacité de l'acide mycophénolique glucuronique inactif à être reconverti en sa forme active de l'acide mycophénolique reste encore inconnu. Comme le métabolisme du mycophénolate mofétil est simple, les interactions médicamenteuses sont peu fréquentes. Par contre, puisque son métabolisme est rapide, de grandes doses d'agent doivent être prises afin d'atteindre des niveaux thérapeutiques stables. Le mycophénolate mofétil possède une demi-vie de 18 heures et une clairance plasmatique de 11.6 L/h après ingestion orale (Fulton et al., 1996; Gourishankar et al., 2001). 2) Études cliniques: En 1995, le mycophénolate mofétil a été approuvé par le FDA pour la prévention du rejet d'organes. Depuis, il s'est effectué plusieurs études cliniques pour déterminer la dose idéale de cet agent dans une thérapie préventive primaire. Entre autre, il existe trois études prospectives, multicentriques, randomisées, à double-aveugle, incluant divers centres à travers l'Amérique et l'Europe (The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group, 1996; Jain et al., 1998; Ahsan et al., 1999). Les résultats de ces trois études sont similaires, et ils rapportent que la dose privilégiée du mycophénolate mofétil est de 1 g par jour, en raison de deux fois par jour. De plus, ces études démontrent toutes qu'un protocole incluant le mycophénolate mofétil permet de

réduire significativement le rejet aigu comparativement à l'azathioprine ou le placebo. Trois autres études multicentriques, menées à travers les États-Unis, le Canada, l'Europe et l'Australie, ont été effectuées pour évaluer l'efficacité du mycophénolate mofétil chez des patients transplantés rénaux (Mathew, 1998; US Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group, 1999; Mycophenolate Mofetil Acute Renal Rejection Study Group, 2001). Cependant, les résultats de ces études ne démontrent pas de différences significatives entre un protocole incluant le mycophénolate mofétil *versus* un protocole avec l'azathioprine, à six mois et trois ans posttransplantation. En outre, le mycophénolate mofétil a été démontré à être efficace pour réduire l'incidence de la perte d'allogreffe chez des patients en épisodes de rejet réfractaire (The Mycophenolate Mofetil Renal Refractory Rejection Study Group, 1996; Gourishankar et al., 2001). Les résultats d'études cliniques en transplantation cardiaque démontrent que le mycophénolate mofétil permet de réduire significativement le taux de mortalité, de retransplantation et d'incidence de rejet aigu, à un an posttransplantation (Aleksic et al., Yamani et al., 2000). Les données à trois ans posttransplantation ne sont pas encore complétées, mais il semble que le mycophénolate mofétil permet de réduire significativement les taux de mortalité chez les receveurs, qui est particulièrement causée par les complications cardiovasculaires (Gourishankar et al., 2001 ; Hosenpud et al., 2001). Récemment, des études cliniques effectuées chez des patients transplantés cardiaques rapportent que le mycophénolate mofétil permet de réduire de façon significative la prolifération des lymphocytes B et la production d'anticorps, ainsi que de réduire l'expression des marqueurs d'activation du lymphocyte B (Rose et al., 2001; Weigel et al., 2002). Ces résultats intéressants pourraient expliquer l'efficacité du mycophénolate mofétil à prévenir contre le rejet chronique, puisque la pathogenèse du rejet chronique implique grandement les mécanismes humoraux. Des études cliniques sont présentement en cours pour évaluer l'aspect anti-rejet chronique du mycophénolate mofétil.

3) Autres considérations: Un désavantage à l'utilisation du mycophénolate mofétil est son coût important. En effet, plusieurs centres ont abandonné l'utilisation du mycophénolate mofétil pour revenir à l'azathioprine.

D'ailleurs, une récente étude prospective à court terme, multicentrique et randomisée rapporte que le remplacement du mycophénolate mofétil par l'azathioprine après trois mois de thérapie, dans un protocole incluant le mercaptopurine, la cyclosporine et des stéroïdes, permet une efficacité et un profil de toxicité comparables à une utilisation continue de mycophénolate mofétil, à un an posttransplantation (Sadek et al., 2002). Malgré l'avantage sur le plan monétaire, il reste à évaluer à long terme si une telle substitution en vaut vraiment la peine, compte tenu que le mycophénolate mofétil semble pouvoir réduire l'incidence du rejet chronique, et non pas l'azathioprine.

Effets secondaires et toxicités. Le profil de toxicité du mycophénolate mofétil surpasse largement celui des autres immunosuppresseurs, puisqu'il agit de façon spécifique sur les lymphocytes. Effectivement, le mycophénolate mofétil ne cause pas d'effets délétères au rein, au foie, au cœur, au cerveau ou d'autres organes, et il n'induit pas le diabète ni l'hyperlipidémie. De plus, il ne cause pas plus d'effets secondaires immunitaires (infections opportunistes et cancers) comparativement aux autres agents immunosuppresseurs, voire que le mycophénolate mofétil semble même protéger contre la pneumonie pneumocystique de par son action directe sur le microorganisme (Oz et al., 2000). Les principaux effets secondaires du mycophénolate mofétil sont principalement d'ordre gastrointestinal tels la diarrhée, l'œsophagite, la gastrite, et les ulcères (Fulton et al., 1996). Puisque les cellules qui tapissent les muqueuses ont un grand pouvoir de turnover et qu'elles sont fréquemment remplacées par de nouvelles cellules, elles doivent utiliser constamment les voies de synthèse d'ADN. Or, les agents inhibiteurs de la synthèse de nucléotides affectent souvent ces types cellulaires. Récemment, Schuurman et al. (2002) ont démontré qu'une nouvelle formulation entérique du mycophénolate mofétil, appelée mycophénolate sodium, est aussi efficace et cause moins de toxicités gastrointestinales. Il a également été rapporté que le mycophénolate mofétil peut induire faiblement une dépression des cellules issues de la moelle osseuse et causer la leucopénie ou l'anémie (Kennedy et al., 2002). Une récente étude menée par Weigel et al. (2001) rapporte que des patients transplantés cardiaques

sous traitement de mycophénolate mofétil possèdent des concentrations élevées de guanosine triphosphate au niveau de leurs plaquettes sanguines. Une autre inquiétude demeure les taux importants du métabolite inactif du mycophénolate mofétil, l'acide mycophénolique glucuronique, retrouvé dans les reins des patients traités (Zanker et al., 1996). Cependant, aucune donnée n'existe à date pour incriminer le mycophénolate mofétil à induire une néphrotoxicité. Cependant, une récente étude menée par Shipkova et al. (2002) rapporte que l'acyl glucuronique du mycophénolate mofétil possède des propriétés immunosuppressives et antiinflammatoires, et peut donc contribuer aux effets immunosuppresseurs du mycophénolate mofétil. De manière générale, le mycophénolate mofétil est un agent immunosuppresseur très prometteur puisque son efficacité à prévenir contre le rejet aigu est comparable aux agents conventionnels, et qu'il possède des propriétés anti-rejet chronique en plus d'avoir un bon profil de toxicité. À l'avenir, il ne serait pas étonnant de voir de plus en plus fréquemment l'inclusion du mycophénolate mofétil dans des protocoles d'immunosuppression. Les résultats encourageants des études cliniques sur le mycophénolate mofétil relancent l'investigation préclinique et clinique des autres agents inhibiteurs de la synthèse de nucléotides.

Malononitrilamide FK778

Le malononitrilamide FK778 (aussi connu sous les noms MNA 715 et HMR 1715) est un nouvel analogue du métabolite actif du leflunomide. Le leflunomide (aussi connu sous le nom HWA 486) a été isolé en 1976, mais ce n'est qu'en 1985 que ses propriétés immunosuppressives et antiinflammatoires furent observées dans des modèles d'arthrite rhumatoïde (Bartlett et al., 1985). Le métabolite actif du leflunomide (A77 1726) possède une demi-vie très longue de 11 à 16 jours, rendant son utilisation en transplantation clinique difficile puisque les changements dans les doses ne sont pas rapidement convertis en concentrations plasmatiques, et un ajustement constant des doses doit être effectué pour maintenir un faible écart dans les niveaux plasmatiques (Silva et al., 1997). Cependant, le leflunomide (Arava®) est bien justifié pour traiter

contre l'arthrite rhumatoïde puisque les patients reçoivent des doses fixes (Prakash et al., 1999) (Silva et al., 1997). Effectivement, les résultats des études cliniques de phase II et III rapportent que le leflunomide est un agent sécuritaire et efficace pour le traitement contre l'arthrite rhumatoïde (Schiff et al., 2000). Malgré le profil pharmacocinétique peu séduisant du leflunomide en transplantation, il existe tout de même une étude clinique rétrospective où l'effet du leflunomide a été investigué chez des patients transplantés rénaux et hépatiques (Williams et al., 2002). Les résultats de cette étude rapportent que le leflunomide semble avoir l'efficacité immunosuppressive pour prévenir contre le rejet d'allogreffe rénale et hépatique, et qu'il peut être dosé de façon sécuritaire jusqu'à plus de 300 jours. De plus, les résultats suggèrent que les doses d'inhibiteurs de la calcineurine et de prednisone peuvent être réduites de manière sécuritaire chez des patients ayant des concentrations plasmatiques de leflunomide supérieures à 50 mg/mL. Cependant, l'étude rapporte qu'une grande variation interpersonnelle est observée chez les patients, suggérant que le monitoring de l'agent demeure un important aspect dans son évaluation clinique.

Propriétés immunosuppressives: mécanisme d'action moléculaire et cellulaire.

Durant la dernière décennie, plus de 80 molécules dérivées du leflunomide ont été créées dans le but de remédier au problème de longue demi-vie du leflunomide (Kuo et al., 1996). Parmi elles, le malononitrilamide FK778 a été sélectionné pour fins de développements approfondis. En effet, la structure chimique du FK778 est très similaire au A77 1726, le métabolite actif du leflunomide (Figure 1.7.3). La substitution du groupement méthyle en position R_4 de la molécule A77 1726 avec un groupement $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$ a donné naissance au FK778, un agent avec une meilleure biodisponibilité après administration orale et une demi-vie plus courte, tel qu'observé chez les rongeurs (Silva et al., 1997). Tout comme le leflunomide, le FK778 est un inhibiteur de la voie *de novo* de la biosynthèse des pyrimidines puisqu'il bloque le dihydroorotate déshydrogénase (DHODH), en se liant spécifiquement à l'enzyme (Figure 1.7.4). Le DHODH est l'enzyme responsable de la quatrième étape de la synthèse *de novo* des

pyrimidines, et il est localisé dans la membrane interne de la mitochondrie (Miller et al., 1966). En bloquant le DHODH, il y a interruption dans la production des nucléotides cytosine, thymine et uracile. Or, les pyrimidines sont essentielles pour la synthèse d'ADN et d'ARN, la biosynthèse des lipides membranaires et la glycosylation des protéines (Aleman et al., 1967). Comme pour la synthèse des purines, les lymphocytes T et B dépendent uniquement de la voie *de novo* pour la synthèse des pyrimidines, tandis que les cellules d'autres types ont recourt à la voie de récupération. Il existe une controverse à savoir si le FK778 n'exerce pas ses actions immunosuppressives via un second mécanisme (Oerkermann et al., 1973). En effet, le premier mécanisme d'action qui a été attribué au métabolite actif du leflunomide est l'inhibition des protéines tyrosines kinases associées aux récepteurs membranaires (Xu et al., 1995; Elder et al., 1997). Cependant, il a été démontré par la suite que l'inhibition de l'activité tyrosine kinase requiert des doses au-delà des concentrations requises pour causer des effets antiproliférateurs. Néanmoins, il est possible que les doses utilisées *in vivo* soient suffisamment grandes pour que l'inhibition de l'activité tyrosine kinase puisse contribuer à l'effet antiproliférateur du FK778 (Klupp et al., 2001). Puisque le leflunomide et son métabolite actif, le A77 1726, inhibent la prolifération des lymphocytes T, l'activation des lymphocytes B indépendante du lymphocyte T, la production d'anticorps IgG et IgM, et les cellules musculaires lisses, il est justifié de croire que le malononitrilamide FK778 possèdent des propriétés similaires. En effet, il a été rapporté que le FK778 inhibe la prolifération des lymphocytes T, indépendamment de la voie de stimulation, chez différentes espèces (Kurrle et al, 1997). Une étude menée par Qi et al. (1998) démontre que le FK778 inhibe la prolifération des lymphocytes B humains, ainsi que la production d'anticorps IgG et IgM. En outre, il a été démontré que le FK778 inhibe la prolifération *in vitro* des cellules musculaires lisses stimulées avec le PDGF, altère la fonction des monocytes et des macrophages, et réduit la formation des radicaux libres (Czech et al., 1999; Schorlemmer et al., 1999a; 1999b). Des études *in vivo* comparant l'efficacité du FK778 et du leflunomide rapportent que le malononitrilamide FK778 est très efficace à prévenir contre le rejet d'allogreffe cardiaque et le rejet de

xénogreffe chez le rat, comparativement à une thérapie au leflunomide (Lin et al., 1996). La substitution du leflunomide par la FK778 pour fins de transplantation semble être une avenue intéressante. Depuis le développement de la molécule FK778 au milieu des années 90, plusieurs études ont été effectuées pour évaluer les propriétés de cet agent immunosuppresseur dans différents modèles expérimentaux.

Études précliniques. Puisque le FK778 possède des propriétés antiprolifératrices sur les lymphocytes T et B et sur la production d'anticorps, les études initiales ont surtout évalué l'effet de cette molécule dans des modèles de la maladie du greffon contre l'hôte, de xénogreffe, et de maladies autoimmunes. En effet, Scholermmer et al. (1996 ; 1997a) ont démontré que le FK778 inhibe le développement de la maladie du greffon contre l'hôte de type aigu et chronique chez la souris. De plus, les auteurs ont démontré que le FK778 combiné à la cyclosporine permet la prévention du rejet hyperaigu dans un modèle de xénogreffe de peau, et que les taux d'anticorps IgG et IgM contre la xénogreffe sont significativement réduits suite à un traitement au FK778 (Scholermmer et al., 1997b ; 1998). En outre, Gysemans et al. (2001) ont rapporté que la combinaison du FK778 et de la cyclosporine permet de prévenir la défaillance du greffon et de retarder le développement du rejet de xénogreffe dans un modèle de transplantation d'îlots pancréatiques chez des rats diabétogéniques non-obèses. En addition, le FK778 a été démontré à prévenir différents types de désordres autoimmunes dans plusieurs modèles expérimentaux comme le l'arthrite rhumatoïde, l'encéphalomyélite allergique expérimentale et le lupus érythémateux (Scholermmer et al., 1997c; 1997d; 1998; 1999c). Après avoir exploré les différentes applications possibles de cette molécule, l'investigation des effets de cet agent à prévenir contre le rejet d'organes a repris de plus bel. En effet, différents groupes ont démontré que la combinaison du FK778 et de la cyclosporine permet de prévenir de manière synergique contre le rejet aigu d'allogreffe, de renverser le rejet aigu installé et de réduire les taux d'anticorps anti-donneur dans un modèle de transplantation cardiaque chez le rat (Lindner et al., 1998; Qi et al., 1998; Gerauer et al., 1998). Qi et al. (1999) ont également

rapporté que la combinaison du FK778 et du tacrolimus produit des effets additifs dans la prévention du rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez le rat. Enfin, il a été démontré que le FK778 est efficace pour prévenir contre le rejet aigu d'allogreffe rénale chez le chien. Kyles et al. (2002; 2003) ont récemment rapporté qu'une combinaison du FK778 et de la cyclosporine en émulsion permet de prolonger de manière significative la survie des allogreffes rénales chez des chiens histoincompatibles. De plus, Jin et al. (2002) ont démontré qu'une combinaison de FK778 (4 mg/kg, concentrations plasmatiques de 40-100 µg/mL) et de tacrolimus ou cyclosporine permet de prolonger de manière synergique la survie des allogreffes rénales chez le chien.

Effets secondaires et toxicités. Puisque le FK778 est encore à ses débuts d'investigation, peu de données existent sur son profil de toxicité. Cependant, dans les plus récentes analyses effectuées chez des chiens, il est rapporté que les toxicités gastrointestinales sont les effets secondaires les plus importants du FK778, et qu'ils sont habituellement observés à des fortes doses d'agent (Jin et al., 2002). Cependant, aucune étude n'a rapporté que les malononitrilamides ou le leflunomide causent la néphrotoxicité, les désordres cardiovasculaires ou le diabète. Puisque le malononitrilamide FK778 est un inhibiteur de la synthèse de nucléotides, il est justifié de croire que son profil de toxicité serait tout aussi intéressant que celui du mycophénolate mofétil. Le FK778 demeure alors une molécule intéressante sur le plan des effets secondaires. Il reste à savoir s'il est tout aussi efficace à prévenir contre le rejet aigu d'allogreffe lorsque mis en combinaison avec des agents immunosuppresseurs conventionnels, autant chez les rongeurs que chez le primate non-humain.

FIGURE 1.7.1. Structure chimique et pharmacocinétique du mycophénolate mofétil

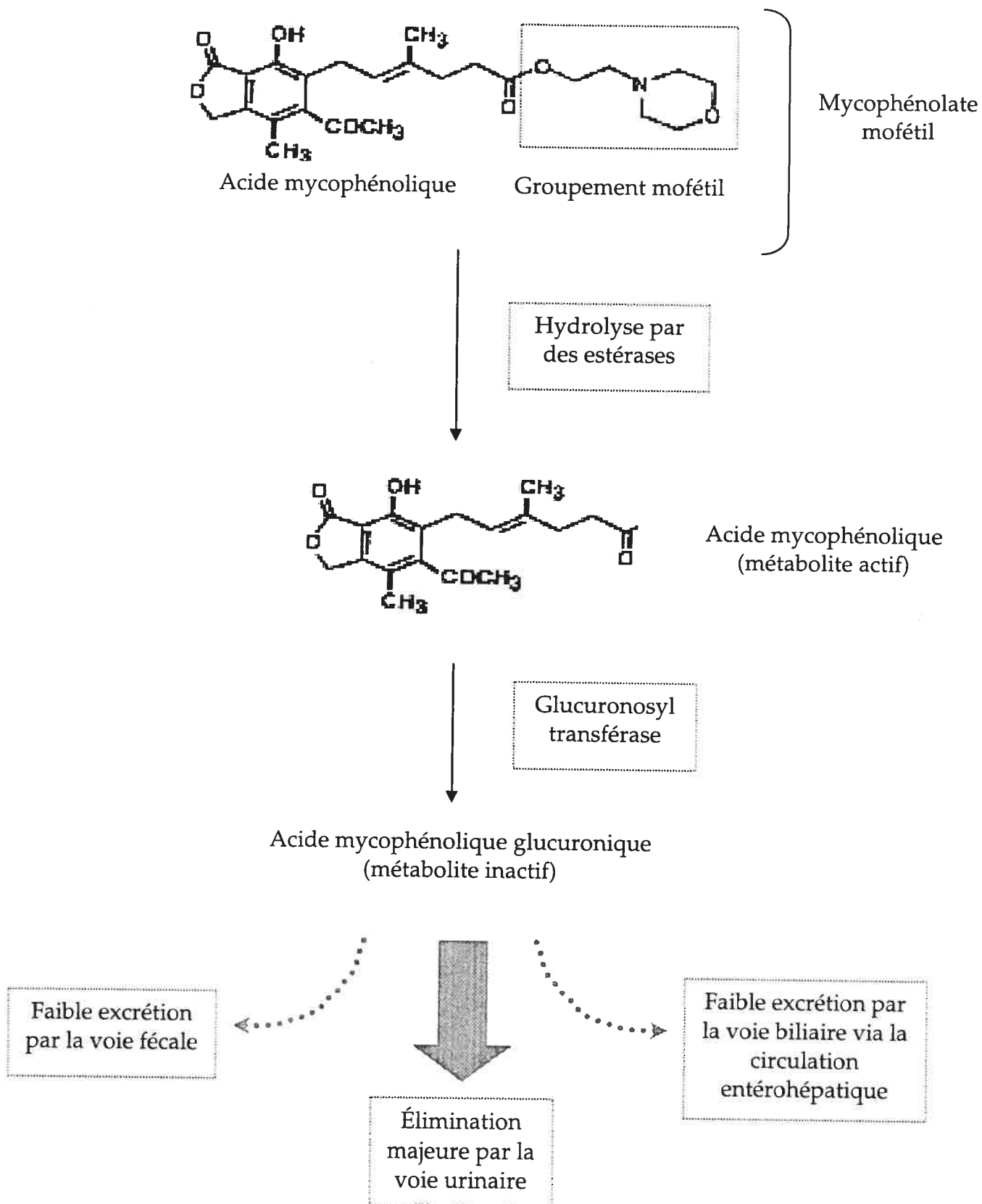


FIGURE 1.7.2. Mécanisme d'action du mycophénolate mofétil

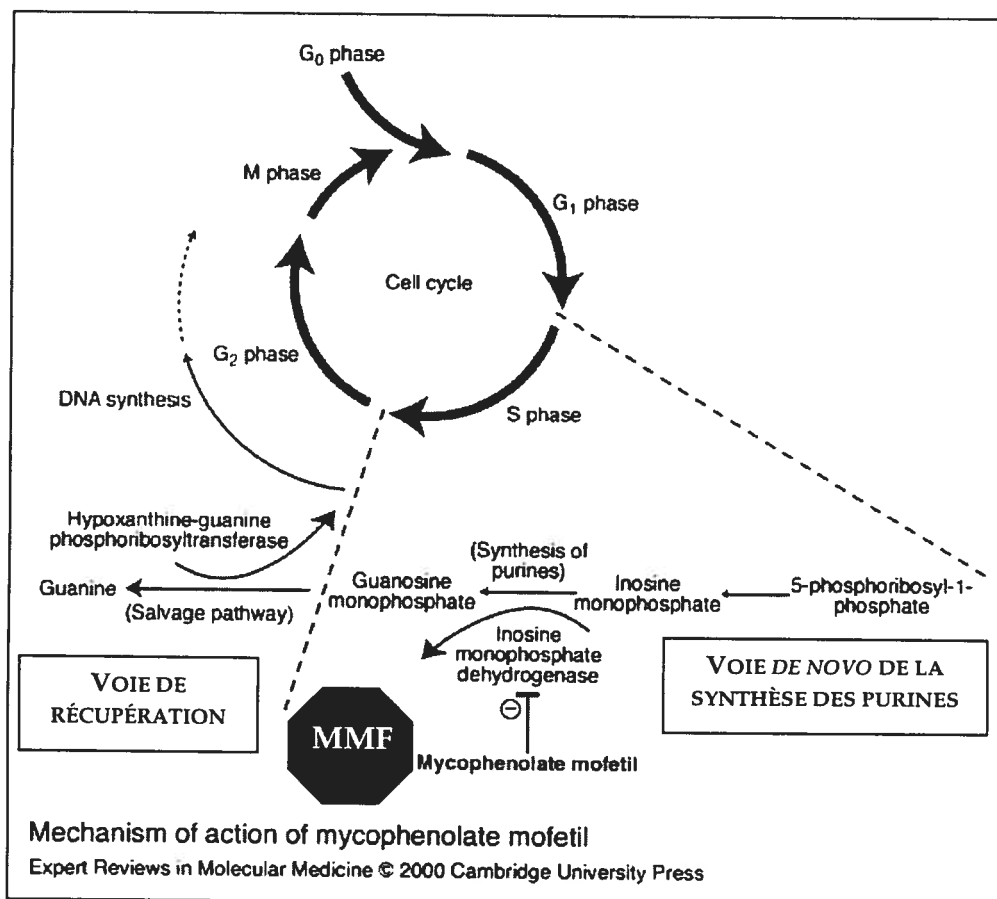


FIGURE 1.7.3. Structure chimique du leflunomide et des malononitrilamides

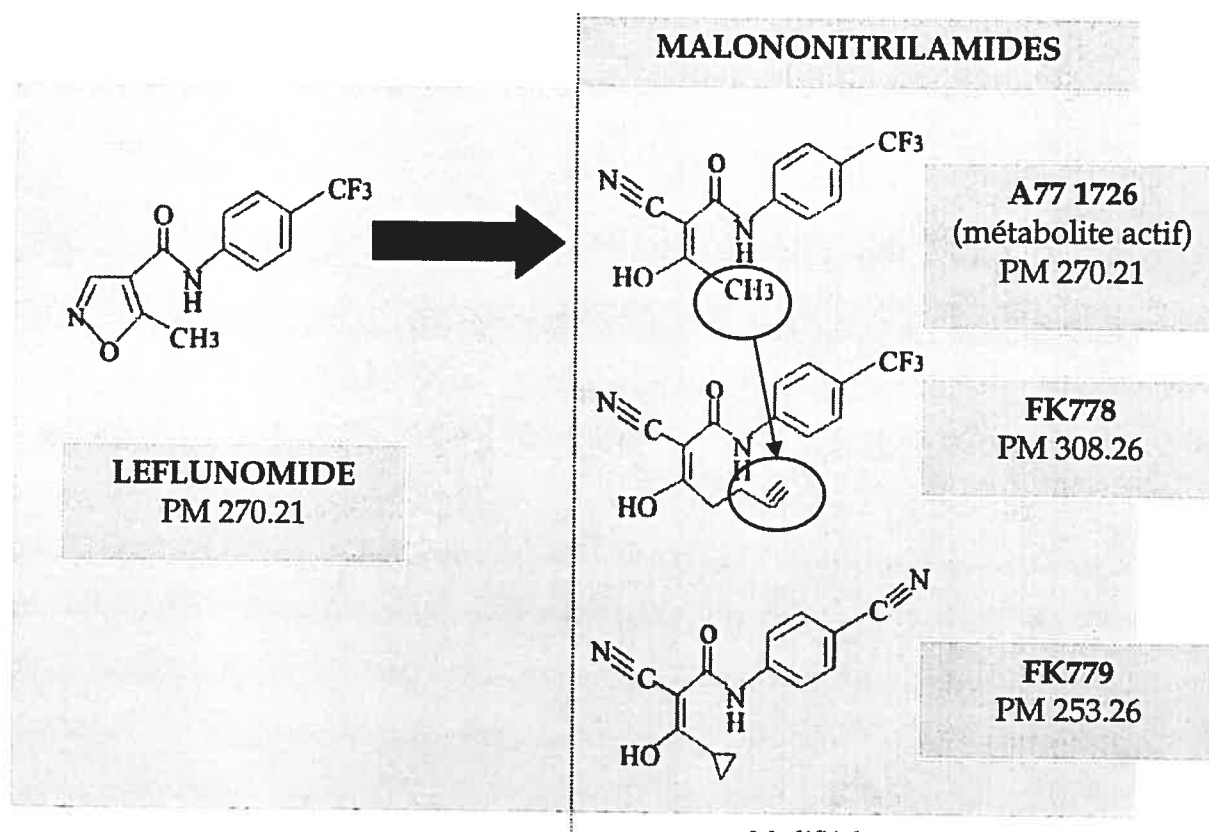
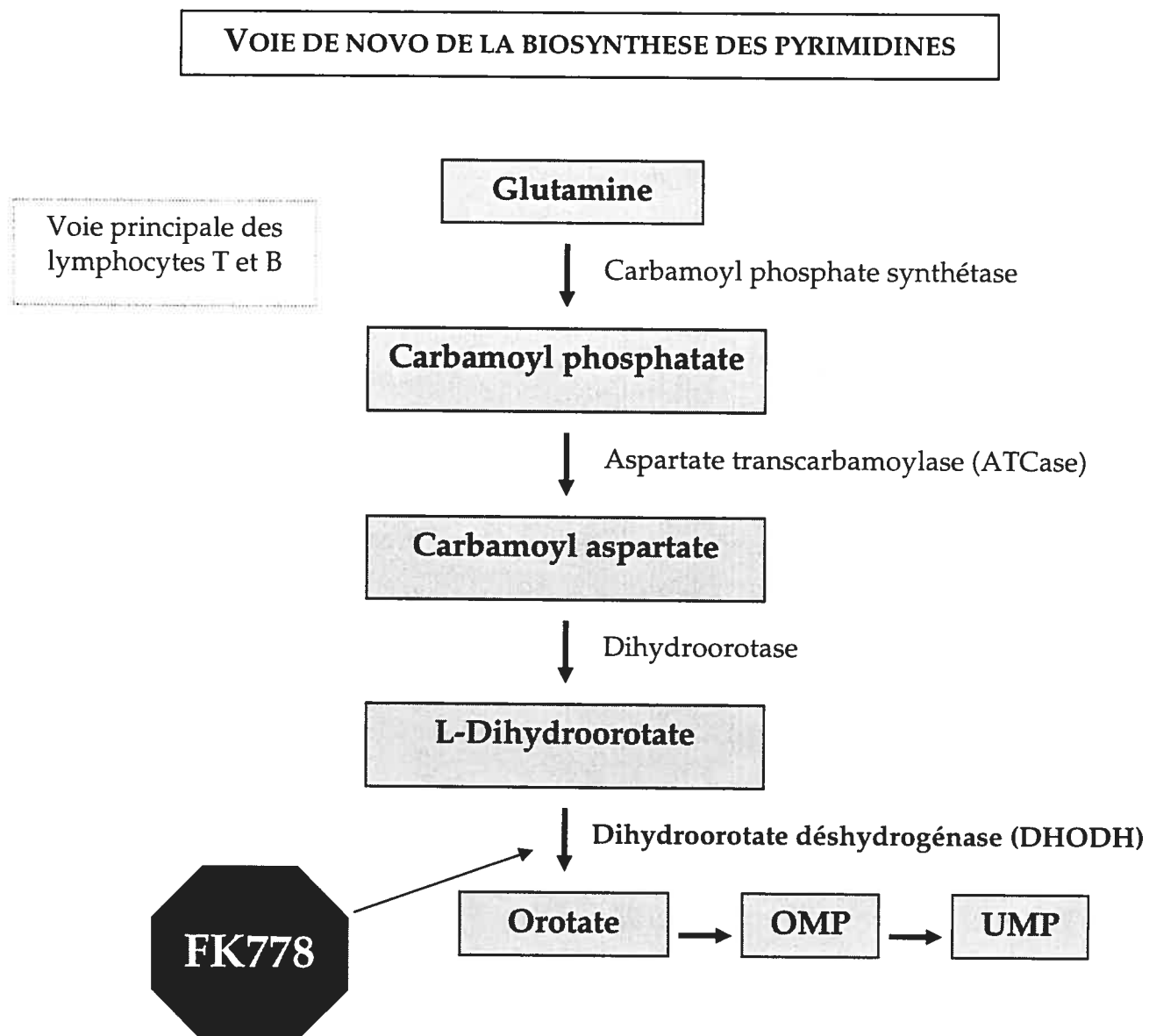


FIGURE 1.7.4. Mécanisme d'action du malononitrilamide FK778



1.8 THÉRAPIES ANTI-MOLÉCULES D'ADHÉSION

WAY-160279

Propriétés immunosuppressives: mécanisme d'action cellulaire. WAY-160279 est un antagoniste sélectif, synthétique, de faible poids moléculaire, de la molécule d'adhésion VLA-4 (*very late antigen-4*), développé comme agent immunosuppresseur dans les laboratoires de Wyeth. Des essais de liaison démontrent que la molécule WAY-160279 se lie de manière sélective à VLA-4 (communication personnelle avec le Dr Jeffrey Kennedy). La molécule VLA-4 est une $\beta 1$ -intégrine (aussi connue sous les noms $\alpha 4\beta 1$ et CD49dCD29) qui est la principale molécule d'adhésion retrouvée sur les leucocytes (par exemple, les lymphocytes, les basophiles, les éosinophiles, les monocytes, sauf les neutrophiles), et elle est responsable de l'interaction entre les leucocytes et les cellules endothéliales vasculaires durant les étapes du roulement leucocytaire et de la ferme adhésion lors du recrutement des leucocytes dans le greffon (Figure 1.3.4). La molécule d'adhésion VLA-4 interagit avec la molécule VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), son ligand primaire, qui est exprimée sur les cellules endothéliales, mais aussi avec la fibronectine qui est présente dans la matrice extracellulaire. Les interactions cellulaires impliquant les molécules d'adhésion VLA-4 et VCAM-1 ont été rapportées à jouer un rôle important dans le rejet d'allogreffe (Isobe et al., 1994; Korczak-Kowalska et al., 1996). En effet, en se liant à VLA-4, la molécule WAY-160279 bloque l'interaction du leucocyte activé et de la cellule endothéliale vasculaire. Le leucocyte activé (par exemple, le lymphocyte T), suite au processus de reconnaissance allogénique, ne pourra pas migrer de manière efficace dans l'allogreffe puisque son roulement et son adhésion sur l'endothélium sont altérés par la molécule WAY-160279. De plus, en se liant avec la molécule VLA-4, WAY-160279 empêche VLA-4 d'interagir avec la fibronectine de la matrice extracellulaire, et il inhibe donc la rétention des leucocytes activés au site de l'inflammation, c'est-à-dire dans l'allogreffe. En bloquant les interactions de la molécule VLA-4, la migration cellulaire dépendante de VLA-4 sera altérée, et la probabilité d'activation des cellules résidentes sera réduite

puisque la molécule VLA-4 possède aussi une fonction de costimulation sur les leucocytes, particulièrement les lymphocytes T, les monocytes, les macrophages, les éosinophiles et les mastocytes (Abbas et al., 2000).

Études précliniques. Puisque l'investigation de la molécule WAY-160279 est à ses tous débuts, il n'existe encore aucune donnée disponible sur cet agent. Par contre, d'autres traitements anti-VLA-4 ont été développés, et les études effectuées sur ces agents permettent d'avoir une bonne idée des effets immunosuppresseurs que la molécule WAY-160279 pourrait exercer, et qui sont à ce jour encore indéterminés. Il a été démontré qu'un traitement d'anticorps monoclonaux anti-VLA-4, administré durant les étapes précoces du rejet aigu, permet d'altérer la migration lymphocytaire nécessaire dans l'activation des lymphocytes T, et de prolonger la survie des allogreffes. En effet, dans une élégante étude, Isobe et al. (1994) ont démontré qu'un traitement de PS/2, un anticorps monoclonal contre VLA-4, permet de prolonger significativement la survie des allogreffes cardiaques chez la souris. De plus, les auteurs démontrent qu'un traitement au PS/2 chez des souris immunisées avec la γ -globuline humaine, au moment de l'immunisation, inhibe la production d'anticorps spécifiques normalement observée. En outre, dans un modèle de transplantation cornéenne, Hori et al. (1998) rapportent que l'utilisation d'un anticorps monoclonal contre VLA-4 combiné à un anticorps monoclonal anti-LFA-1 permet d'induire une tolérance immunologique. Enfin, une étude menée par Tice et al. (1996) démontre qu'un traitement d'anticorps monoclonal anti-VLA-4 combiné avec la cyclosporine permet de prolonger de manière synergique la survie d'allogreffe dans un modèle de transplantation intestinale chez le rat. Dans une élégante étude menée par Coito et al. (1998), les auteurs rapportent que la molécule VLA-4 se lie avec la fibronectine, une protéine proéminente dans la matrice extracellulaire, et que les interactions entre le VLA-4 et la fibronectine induisent spécifiquement la migration et l'adhésion des cellules lymphoïdes. En effet, l'inhibition de l'interaction entre le VLA-4 et la fibronectine a été démontrée à prévenir contre le rejet aigu, en réduisant l'infiltration et l'accumulation des cellules mononucléaires dans

l'allogreffe, voire en inhibant l'expression des cytokines proinflammatoires et l'activation des cellules endothéliales, dans un modèle de transplantation cardiaque chez le rat. Par contre, les auteurs n'ont pas utilisé un antagoniste de VLA-4 mais plutôt un traitement anti-fibronectine pour bloquer les interactions entre VLA-4 et la fibronectine. Même si la molécule VLA-4 est le ligand primaire de la fibronectine, il existe quand même une possibilité que la fibronectine agisse avec d'autres molécules impliquées dans le rejet aigu qui sont encore inconnues. Cependant, une étude rapporte qu'un traitement anti-VLA-4 utilisant des anticorps monoclonaux permet de prolonger significativement la survie des allogreffes d'îlots pancréatiques chez le rat, et de retarder le développement du rejet aigu. Le fait de bloquer les interactions de la molécule VLA-4 ne permet pas seulement de prévenir contre le rejet aigu d'allogreffe, mais aussi contre l'athérosclérose et les maladies rénales. En effet, Zohlnhöfer et al. (1999) ont démontré que l'interaction entre les monocytes et les cellules endothéliales, via les molécules d'adhésion VLA-4 et VCAM-1, induit l'activation du facteur nucléaire NF κ B dans les deux types cellulaires. Ceci entraîne une augmentation de l'expression génique et la production d'IL-1 par les monocytes. En revanche, l'IL-1 stimule les cellules endothéliales à libérer l'IL-6. Dans l'athérosclérose, les monocytes adhèrent à l'endothélium des lésions athérosclérotiques, qui est préalablement activé par l'IFN- γ . En bloquant l'interaction des monocytes et des cellules endothéliales, la production des cytokines proinflammatoires IL-1 et IL-6 est inhibée, et la phase précoce de la cascade inflammatoire, observée dans l'athérosclérose, est alors inhibée. Enfin, la molécule VLA-4 a été rapportée à jouer un rôle dans les maladies rénales. En effet, VLA-4 est faiblement exprimé dans les reins normaux. Cependant, il semble que son expression est significativement augmentée dans les reins défailants de patients en hémodialyse, dans les reins de patients souffrant de glomérulonéphrite, et dans les allogreffes rénales de patients transplantés (Rabb et al., 1995). L'utilisation de la molécule WAY-160279 en tant qu'agent immunosuppresseur semble très intéressant puisqu'en plus de posséder des propriétés immunosuppressives pour prévenir contre le rejet aigu et chronique (athérosclérose), l'agent WAY-160279 peut inhiber les effets délétères sur le rein.

Considérant le problème important de la néphrotoxicité induite par les inhibiteurs de la calcineurine, un protocole d'immunosuppression incluant la molécule WAY-160279 et le tacrolimus serait une avenue très intéressante puisque la combinaison des deux agents pourrait permettre de prévenir contre le rejet aigu de manière synergique (compte tenu que ces deux agents possèdent des mécanismes d'action distincts), et l'effet néphroprotecteur de la molécule WAY-160279 pourrait réduire les dommages de la néphrotoxicité induite par le tacrolimus.

Effets secondaires et toxicités. Il est encore trop prématuré pour se prononcer sur les effets indésirables de l'agent WAY-160279. Par contre, on peut s'imaginer que son effet antiinflammatoire et son action sur l'immunité innée pourraient contribuer à l'augmentation du risque d'infections opportunistes. Cependant, il reste à vérifier si le risque est plus grand que ceux des immunosuppresseurs conventionnels actuellement utilisés.

rPSGL-Ig

Le rPSGL-Ig est une protéine de fusion recombinante de la forme soluble du PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*). Conçue dans les laboratoires de Wyeth, cette molécule dimère consiste en la partie amino terminale de 47 acides aminés et de la portion carboxyle de la molécule PSGL-1 mature, fusionnée à la portion Fc de l'IgG1 humain (Sako et al., 1993). La portion IgG1 du rPSGL-1 a été mutée dans le domaine CH2 pour éviter les liaisons aux récepteurs Fc et l'activation de la voie classique du complément. La molécule rPSGL-Ig possède une demi-vie de 100 ± 19 heures chez le rat (Khor et al., 2000). Des cellules CHO (cellules d'ovaires de hamster chinois) ont été transfectées de manière stable avec un vecteur d'expression d'ADN codant pour rPSGL-Ig, et aussi des vecteurs d'expression du $\alpha(1,3)$ fucosyltransférase et du $\beta(1,6)$ -N-acétylglucos-amylotransférase. Ces deux enzymes dirigent la synthèse de la structure du sialyl Lewis^x (sLe^x) sur la partie glycans du rPSGL-Ig, un site critique pour l'activité de

liaison avec les sélectines. Le rPSGL-Ig actif, dépourvu d'endotoxine, a été ensuite purifiée des cellules CHO (Amersi et al., 2002).

Propriétés immunosuppressives: mécanisme d'action cellulaire. Le PSGL-1 est une glycoprotéine de type mucine, homodimère, liée par des ponts disulfures, et il est retrouvé sur les leucocytes (Sako et al., 1993). Le PSGL-1 est le ligand primaire de la P-sélectine, mais il peut aussi interagir avec la E-sélectine, et de moindre affinité, avec la L-sélectine. La P-sélectine (aussi connue sous le nom CD62P) fait partie de la famille des sélectines impliquées dans la phase précoce de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium activé, lors de la réponse inflammatoire (Moore et al., 1995; Asa et al., 1995; Chamoun et al., 2000). La P-sélectine est une glycoprotéine de surface qui est principalement responsable des interactions entre les leucocytes et les cellules endothéliales, et celles entre les leucocytes et les plaquettes activées, lors des étapes du roulement leucocytaire et de la transmigration vers le site d'inflammation, c'est-à-dire vers l'allogreffe dans le cas de la transplantation (Furie et al., 1995; Moore et al., 1995). La P-sélectine est entreposée de manière constitutive dans les corpuscules de Weibel-Palade des cellules endothéliales et les α -granules des plaquettes sanguines (Furie et al., 1995). Suite à une stimulation inflammatoire, soit par la présence de thrombine ou de cytokines proinflammatoires, la P-sélectine est rapidement exprimée et mobilisée à la surface cellulaire. Il a été rapporté qu'en réponse à une injure tissulaire, le roulement leucocytaire sur l'endothélium activé se fait principalement via la P-sélectine (Chamoun et al., 2000; Griffin et al., 1990). La E-sélectine (aussi connue sous le nom CD62E) est exclusivement exprimée par les cellules endothéliales activées par des cytokines, et elle est responsable de leur adhésion aux neutrophiles (Bevilacqua et al., 1989). L'expression de la E-sélectine sur les cellules endothéliales est reconnue comme étant le facteur discriminant de l'inflammation aiguë causée par des cytokines (Chamoun et al., 2000). Puisque le rPSGL-Ig possède un domaine de liaison aux sélectines, particulièrement la P-sélectine et la E-sélectine, il entre donc en compétition avec le PSGL-1. En interagissant avec la P-sélectine, le rPSGL-Ig bloque les interactions entre les leucocytes

et les cellules endothéliales, et celles entre les leucocytes et les plaquettes activées. Or, les étapes de roulement leucocytaire et de transmigration vers le site d'inflammation sont interrompues. L'accumulation et la rétention des leucocytes responsables du rejet aigu dans l'allogreffe sont alors évitées (Figure 1.8.2). En outre, une étude effectuée par Robert et al. (1999) démontre que les cellules dendritiques expriment une isoforme de la molécule PSGL-1 et qu'elles peuvent interagir avec l'endothélium via les molécules P-sélectine et E-sélectine sur les cellules endothéliales. Puisque les cellules dendritiques jouent un rôle important dans la réponse inflammatoire et la reconnaissance allogénique, le blocage des interactions cellulaires entre les cellules dendritiques et les cellules endothéliales représente un effet immunomodulateur important du rPSGL-Ig.

Études précliniques. Il a été rapporté que le rPSGL-Ig peut se lier à la P-sélectine et à la E-sélectine exprimées sur les cellules endothéliales et les plaquettes. Des récentes études ont démontré qu'un traitement de rPSGL-Ig protège contre les dommages de l'ischémie/reperfusion. En effet, Amersi et al. (2002) ont démontré dans un modèle d'isogreffe hépatique stéatosique chez le rat (rat Zucker obèse → rat Zucker maigre), qu'un prétraitement des foies obèses avec le rPSGL-Ig, avant la transplantation, permet de prolonger significativement la survie des rats receveurs de 40% à 90%. Les auteurs rapportent que cette prolongation de survie corrèle avec une amélioration significative de la fonction hépatique, une réduction de l'activité des neutrophiles, et une diminution des aspects histologiques de l'altération hépatocytaire. De plus, un prétraitement de rPSGL-Ig permet de diminuer l'infiltration des lymphocytes CD3⁺/CD25⁺ (lymphocytes T activés) et de réduire l'expression génique des cytokines proinflammatoires, incluant le TNF- α , l'IL-6, l'oxyde nitrique inductible, l'IL-2 et l'IFN- γ , sans toutefois affecter les niveaux d'ARN messagers codant pour l'IL-4. Ainsi, les auteurs soulignent qu'une inhibition des interactions impliquant la P-sélectine, via un traitement au rPSGL-Ig, protège contre les dommages sévères de l'ischémie/reperfusion normalement observés dans des foies stéatosiques. De plus, il a été rapporté dans une étude qu'un prétraitement au rPSGL-Ig des rats receveurs d'isogreffes rénales, qui ont subi une

ischémie froide de plus de 24 heures, permet de réduire considérablement les dommages structuraux des cellules tubulaires, voire de diminuer le flot sanguin de la médulla externe (Fuller et al., 2001). Les auteurs suggèrent que le flot sanguin de la médulla externe joue un rôle crucial dans le développement des dommages de l'ischémie/reperfusion chez les greffons rénaux ayant subi une longue période de préservation froide. D'autres études effectuées dans le modèle d'ischémie rénale rapportent des effets bénéfiques d'une thérapie au rPSGL-Ig (Pratschke et al., 2001; Takada et al., 1997). Wang et al. (2002) ont récemment rapporté qu'un traitement au rPSGL-Ig permet de minimiser les dommages de l'ischémie/reperfusion dans un modèle d'occlusion de l'artère coronaire utilisant un ballonnet, chez le chien. Les auteurs rapportent qu'une thérapie au rPSGL-Ig, 15 minutes avant la reperfusion, permet de réduire significativement l'étendue de la surface infarctée, l'infiltration des neutrophiles au niveau du cœur et l'activité myéloperoxydase. De plus, la fraction d'éjection ventriculaire gauche est beaucoup moins altérée durant les premiers 24 heures chez le groupe traité au rPSGL-Ig, comparativement au groupe témoin. En outre, l'effet cardioprotecteur du rPSGL-Ig contre les dommages de l'ischémie/reperfusion a également été évalué chez le chat (Hayward et al. 1999). Il a également été rapporté qu'une thérapie au rPSGL-Ig permet de réduire les dommages causés par l'ischémie/reperfusion, dans un modèle d'isogreffe intestinale (Farmer et al., 2002). Contrairement aux études évaluant l'effet protecteur du rPSGL-Ig pour réduire des dommages de l'ischémie/reperfusion, il n'existe pas beaucoup de données de l'effet de cette protéine de fusion recombinante dans la prévention du rejet d'allogreffes. Dans une élégante étude menée par Kusaka et al. (1999), les auteurs ont démontré qu'une thérapie combinée du rPSGL-Ig avec des faibles doses de cyclosporine permet de prolonger de manière significative la survie des allogreffes rénales de rat de plus de 200 jours. Les auteurs rapportent également qu'une telle combinaison permet de réduire significativement la production des cytokines proinflammatoires comme le TNF- α et l'IL-1, ainsi que l'infiltration des populations leucocytaires CD4⁺ (lymphocytes T auxiliaires), CD8⁺ (lymphocytes T cytotoxiques) et ED-1⁺ (macrophages) dans

l'allogreffe rénale, comparativement aux allogreffes rénales des receveurs traités à la cyclosporine seulement. Bref, puisque le phénomène d'ischémie/reperfusion est inévitable en transplantation d'organes, et que les dommages qui en découlent altèrent significativement la survie de l'allogreffe, il ne serait pas surprenant de voir à l'avenir des protocoles d'immunosuppression incluant des thérapies anti-molécules d'adhésion comme le rPSGL-Ig.

Effets secondaires et toxicités. Il existe très peu de données sur le profil de toxicité du rPSGL-Ig. Récemment, Opal et al. (2001) ont rapporté que le rPSGL-Ig diminue significativement l'infiltration locale de neutrophiles et la clairance bactérienne sans toutefois augmenter les niveaux systémiques de cytokines proinflammatoires et de bactéries, et le taux de mortalité dans un modèle de ponction et ligature caecale. Il est indéniable que des études de toxicité se doivent d'être effectuées avant que ce nouvel agent immunosuppresseur soit évalué dans des études cliniques.

Figure 1.8.1. Mécanisme d'action de la molécule WAY-160279

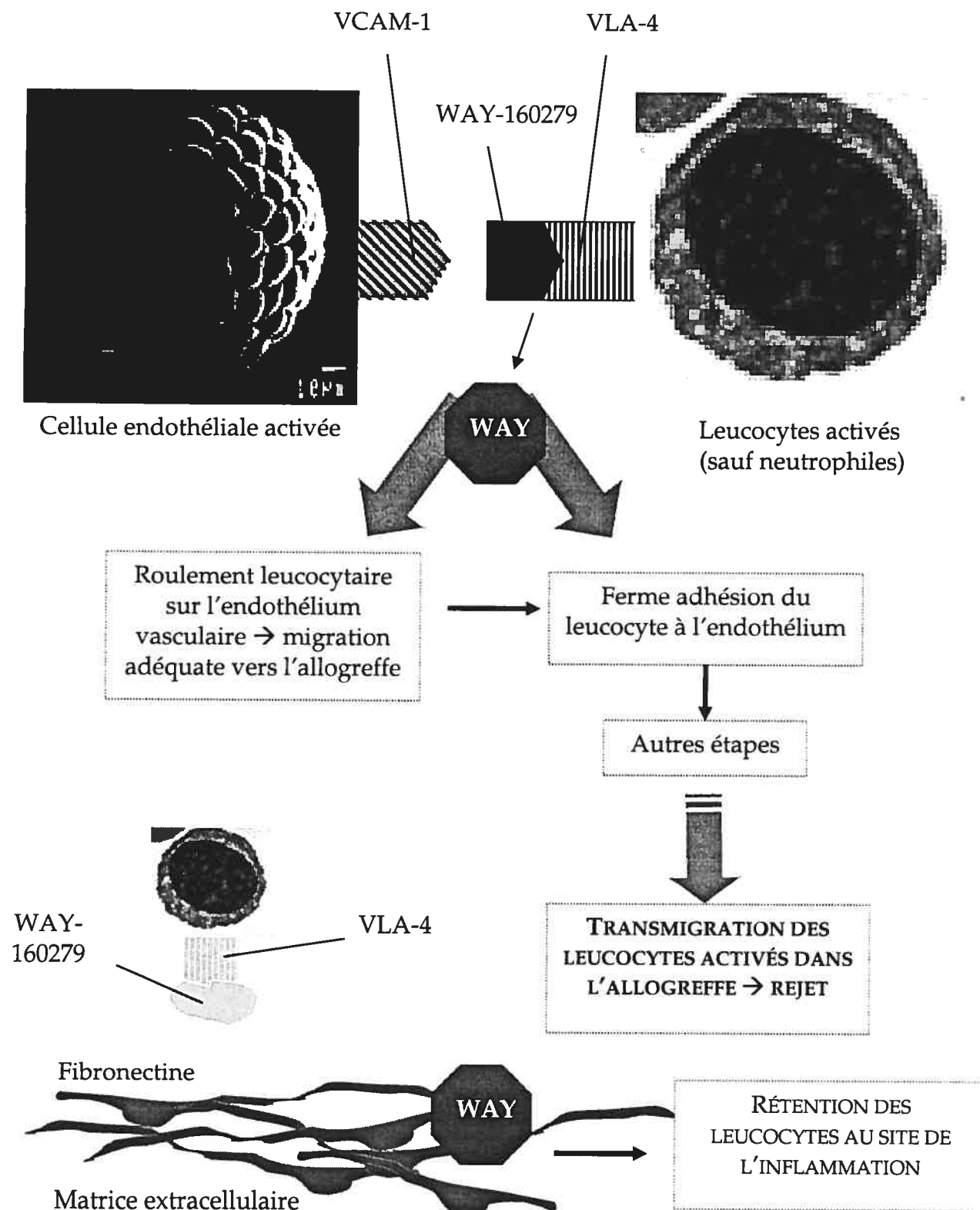
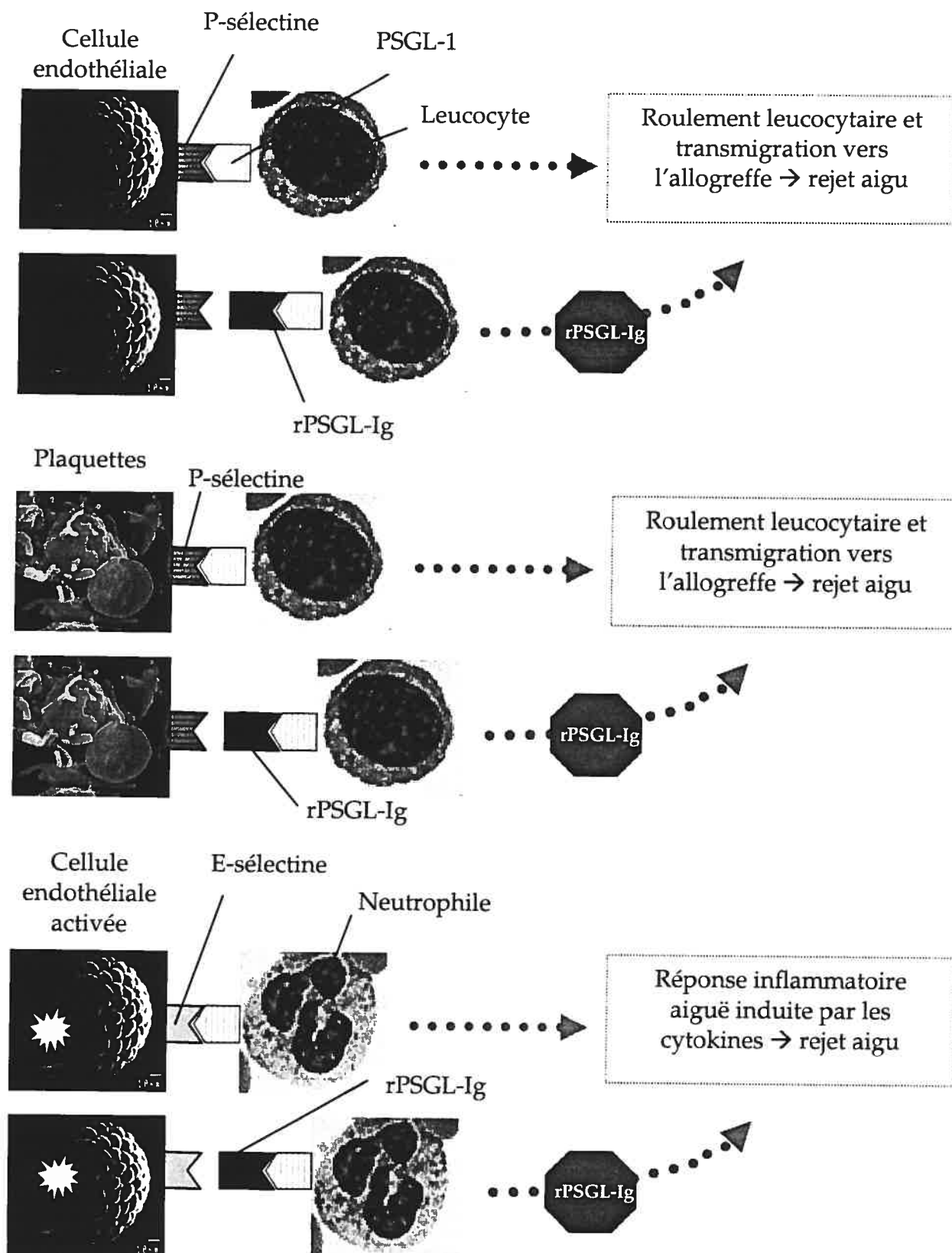


Figure 1.8.2. Mécanisme d'action de la protéine de fusion rPSGL-Ig



1.9 MODÈLES EXPÉRIMENTAUX

Test de prolifération

Le rejet aigu est causé par des lymphocytes qui reconnaissent et détruisent une allogreffe exprimant des molécules MHC étrangères. Ce processus peut être étudié *in vivo*, à l'aide de modèles de transplantations chez les animaux, mais son analyse en profondeur nécessite la mise au point de son équivalent *in vitro*. Le test de prolifération utilisant des mitogènes polyclonaux demeure un outil très utile pour étudier la propriété et l'efficacité des nouvelles molécules ou thérapies combinées d'agents immunosuppresseurs à inhiber la prolifération lymphocytaire. Le test de prolifération consiste à mettre en culture, selon les conditions environnementales optimales (par exemple, une température de 37°C, une atmosphère de 5% en CO₂, et des conditions stériles), une population cellulaire en présence de mitogènes polyclonaux (Janeway et al., 1997). Les populations cellulaires peuvent être des lymphocytes, des splénocytes ou des cellules mononucléées du sang périphérique, et elles sont préalablement isolées à l'aide des techniques d'isolation conventionnelles (par exemple, l'utilisation d'une solution de Ficoll où les différentes populations de cellules sanguines sont séparées par centrifugation selon leur densité). Les mitogènes polyclonaux sont des substances de spécificités et d'origines très différentes qui induisent la mitose chez les lymphocytes T et B (Tableau 1.9.1). Parmi les mitogènes polyclonaux les plus utilisés, on retrouve notamment, les phytohémagglutinines (Astaldi et al., 1966), la concanavaline A (Agrawal et al., 1967), le mitogène du pokeweed (Borjeson et al., 1966) et les lipopolysaccharides (Taylor et al., 1966). Bien que les mitogènes polyclonaux n'aient pas une action directe sur les récepteurs spécifiques à l'antigène à la surface des lymphocytes, ils semblent déclencher les mêmes mécanismes que les antigènes à produire une réponse immune. Les lymphocytes sont normalement à l'état de repos, en phase G₀ du cycle cellulaire. Lorsqu'ils sont stimulés par des mitogènes polyclonaux, ils entrent rapidement en phase G₁ et progressent dans le cycle de division cellulaire. L'utilisation de la ³H-thymidine et l'évaluation de son incorporation dans l'ADN des

cellules représentent un indice de croissance cellulaire (Rajewsky et al., 1965). La figure 1.9.1 illustre la technique de prolifération cellulaire utilisée pour évaluer la thérapie combinée du malononitrilamide FK778 et du tacrolimus sur les lymphocytes T et B, chez la souris, le primate non-humain et l'humain.

Combinaison des lignées congéniques

Dans des études abordant les différents types de rejet de greffe, le choix de la combinaison des lignées congéniques de rats donneurs → receveurs est important. En effet, afin d'étudier le rejet aigu d'allogreffe, il est primordial de choisir deux lignées qui représentent une disparité seulement au niveau de leurs complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I et II. Dans ce projet de recherche, nous avons utilisé les combinaisons de lignées (BN → LEW), (BUF → WFu), et (ACI → LEW). De manière respective, les lignées BN, LEW, BUF, WFu et ACI sont génétiquement représentées par les symboles (RT1ⁿ), (RT1^l), (RT1^b), (RT1^u) et (RT1^a). Ces combinaisons de lignées, dites « complètement allogéniques », reproduisent la nature d'une transplantation entre deux individus génétiquement différents, voire histoincompatibles. Par contre, si on veut étudier le rejet chronique, une combinaison de lignée semi-allogénique (par exemple, LEW (RT1^l) → F344 (RT1^{lv1})) serait plus appropriée, puisqu'on ne veut pas que l'allogreffe soit rejetée de manière aiguë. La combinaison de lignées (BN → LEW) est utilisée de façon considérable dans le modèle de transplantation cardiaque, et elle représente la combinaison de lignées de référence. Dans le cadre de notre première étude, les transplantations hétérotopiques cardiaque et pancréatique (BN → LEW) constituent donc un modèle expérimental de choix pour vérifier l'efficacité de la thérapie combinée du sirolimus et du mycophénolate mofétil dans la prévention et le traitement du rejet aigu. Les combinaisons de lignées (BUF → WFu) et (ACI → LEW) sont aussi des combinaisons de lignées de référence pour la transplantation rénale, bien que la combinaison (ACI → LEW) soit beaucoup plus utilisée.

Transplantation cardiaque, pancréatique et rénale chez le rat

Les transplantations d'organes vascularisés incluant la transplantation cardiaque (Figure 1.9.2), la transplantation pancréatique (Figure 1.9.3) et la transplantation rénale (Figure 1.9.4), chez le rat demeurent un outil indispensable dans l'étude *in vivo* de nouveaux agents immunosuppresseurs. Ces modèles d'études sont bien connus et grandement utilisés en transplantation préclinique. L'annexe 7 résume les techniques chirurgicales propres à chaque méthode, la physiologie de l'organe transplanté et les avantages du modèle d'étude.

TABLEAU 1.9.1. Mitogènes polyclonaux utilisés dans les tests de prolifération

Mitogène	Abréviation	Source	Cellules répondeuses
Phytohémagglutinines	PHA	<i>Phaseolus vulgaris</i> (fèves rouges)	Lymphocytes T humains
Concanavaline A	Con A	<i>Canavalia ensiformis</i> (fèves de Jack)	Lymphocytes T murins
Mitogène du pokeweed	PWM	<i>Phytolacca americana</i> (phytolaque)	Lymphocytes T et B
lipopolysaccharides	LPS	<i>Escherichia coli</i>	Lymphocytes B murins

Reproduit de Janeway et al., 1997.

FIGURE 1.9.1. Évaluation de la thérapie combinée du malononitrilamide FK778 et du tacrolimus à l'aide du test de prolifération

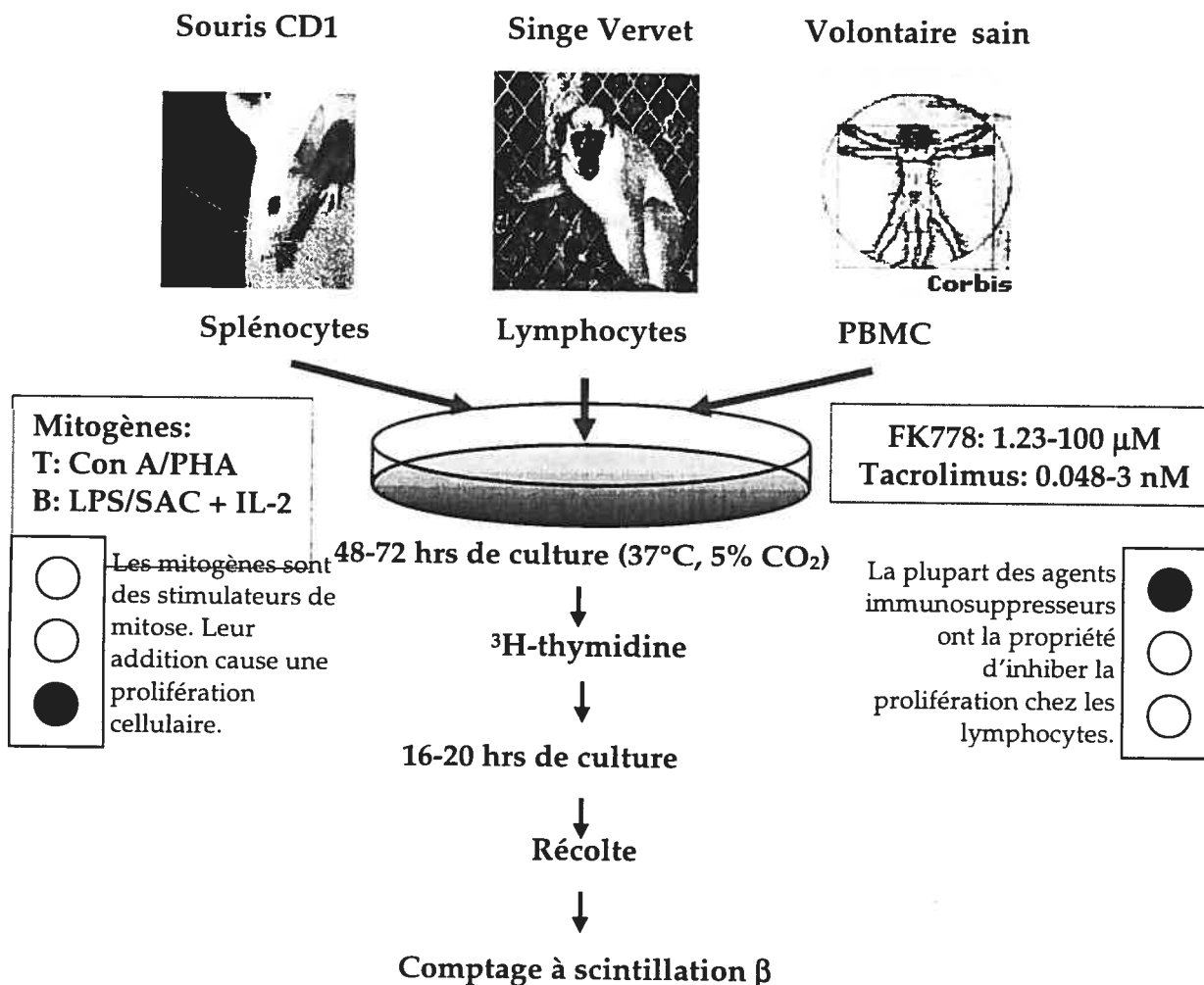
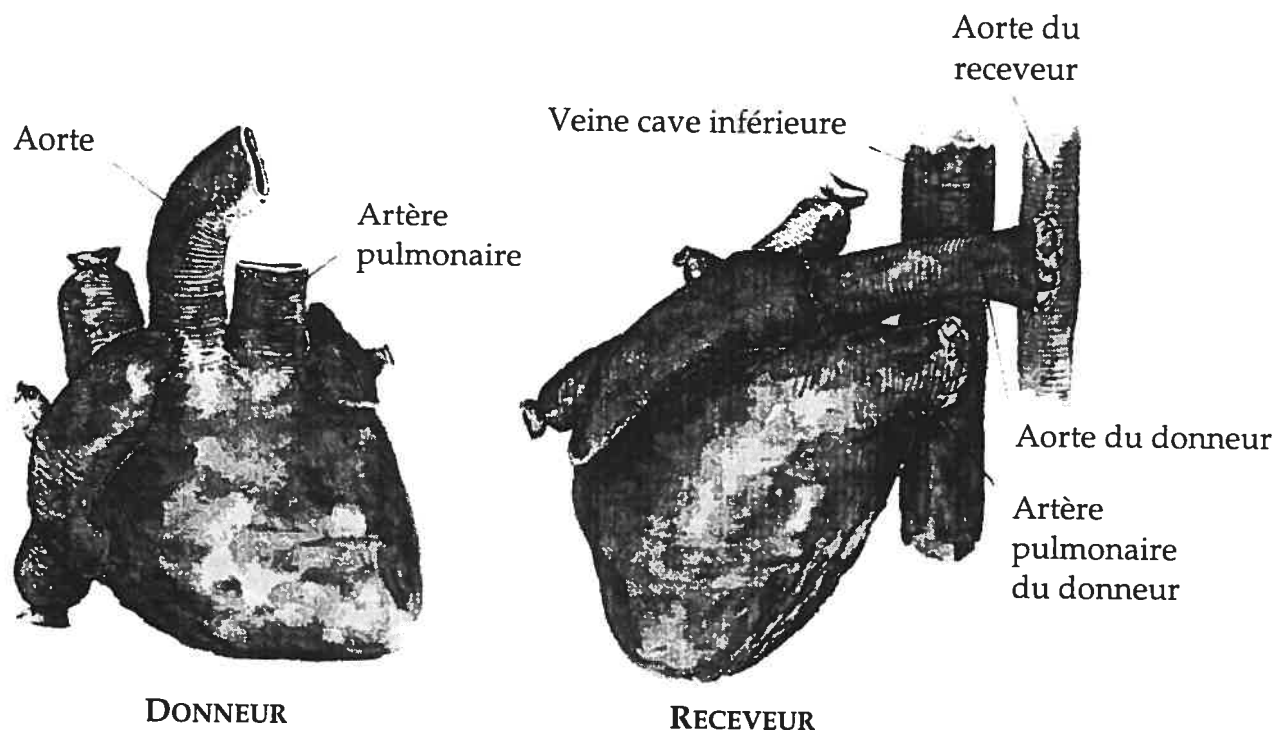
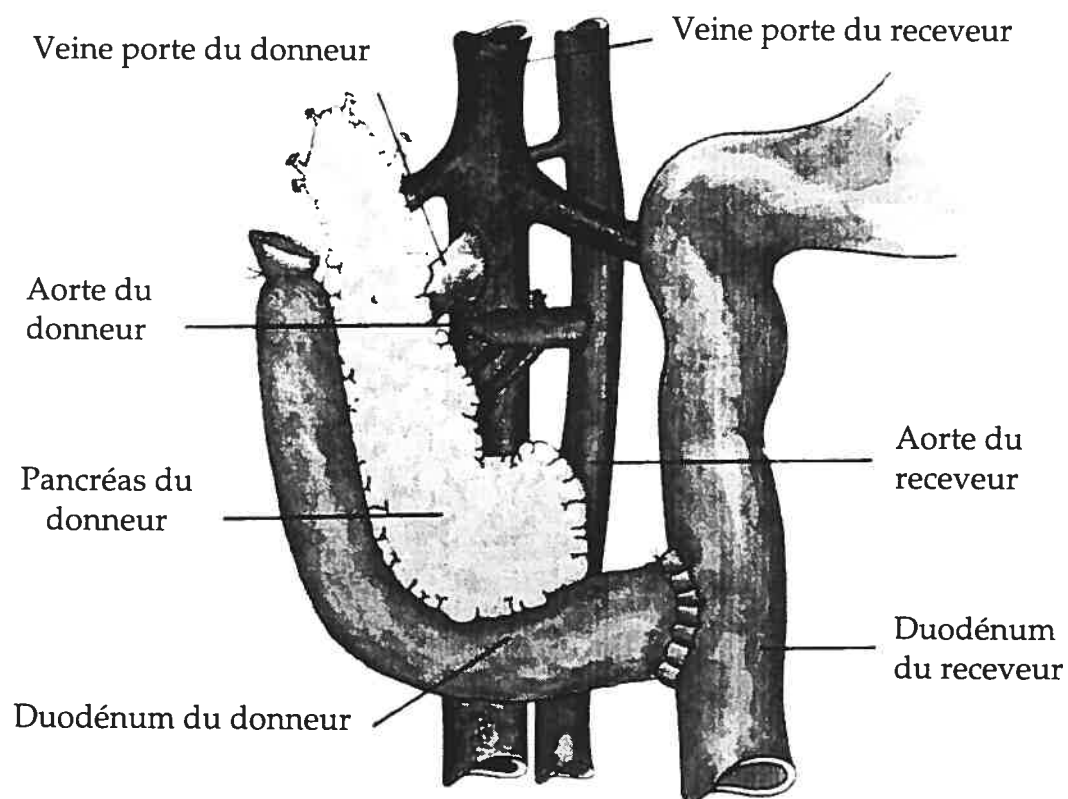


FIGURE 1.9.2. Transplantation hétérotopique cardiaque chez le rat



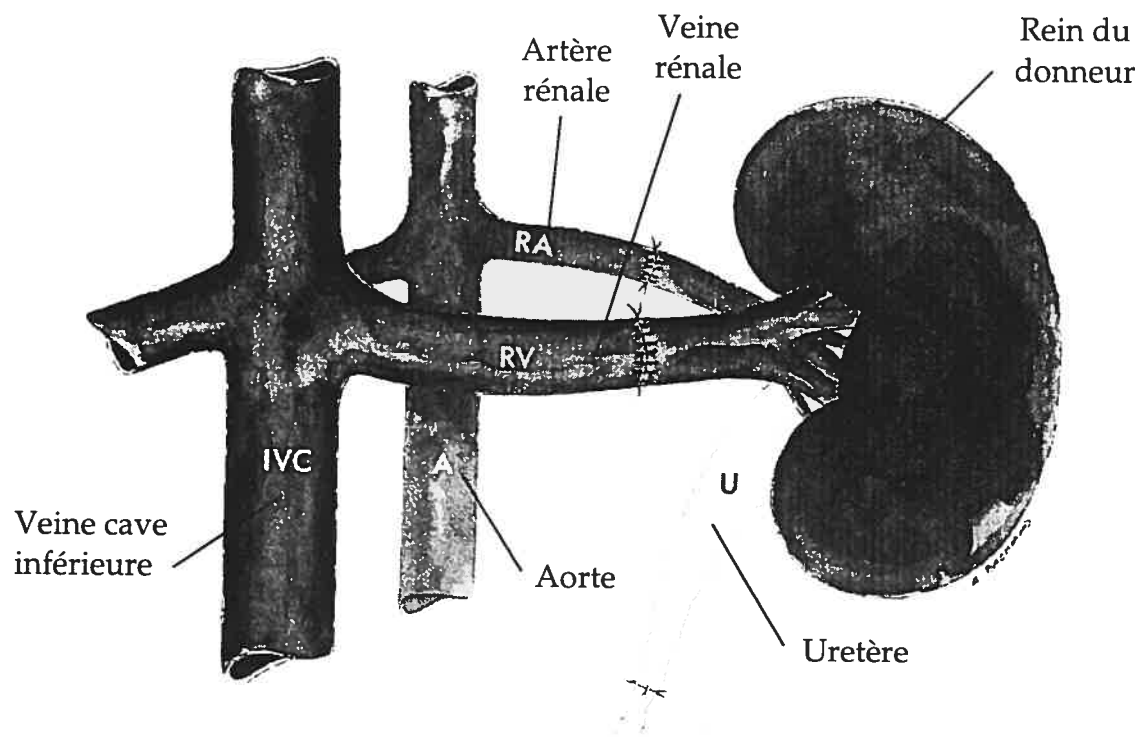
Reproduit de Chen et al., 1995a.

FIGURE 1.9.3. Transplantation hétérotopique pancréatique chez le rat



Reproduit de Chen et al., 1995b.

FIGURE 1.9.4. Transplantation orthotopique rénale chez le rat



Reproduit de Chen et al., 1995c.

1.10 PRINCIPE DE L'EFFET MÉDIAN ET INDEX DE COMBINAISON

Dans ce projet de recherche, nous avons évalué l'effet de différentes nouvelles combinaisons d'agents immunosuppresseurs incluant le mycophénolate mofétil et le sirolimus, le malononitrilamide FK778 et le tacrolimus, le WAY-160279 et le sirolimus, voire le rPSGL-Ig et le sirolimus, la tacrolimus, le mycophénolate mofétil ou la cyclosporine, dans la prévention et le traitement du rejet aigu d'allogreffe. Puisque nous voulons évaluer si ces associations thérapeutiques sont bénéfiques, il est alors primordial de bien définir le type d'interaction entre les agents immunosuppresseurs. Il existe notamment trois désignations pour qualifier l'effet associatif des agents, lorsque chaque agent produit un effet en soi: la synergie, l'additivité et l'antagonisme. Il y a la potentialisation dans le cas où un agent n'aurait pas d'effet en soi mais augmente l'effet thérapeutique de(s) l'autre(s) agent(s) lorsque mis en combinaison. Malheureusement, encore beaucoup trop de scientifiques et cliniciens définissent ces termes de manière erronée. Par simple définition, la synergie est un effet plus grand de celui prévu pour l'effet additif et l'antagonisme est un effet moindre de ce qu'on s'attend de l'effet additif. Il va sans dire que l'additivité prévue se doit d'être clairement définie afin de ne pas induire de confusion.

Il existe plusieurs méthodes pour déterminer la synergie, l'additivité et l'antagonisme. Certaines sont, de toute évidence, incorrectes et d'autres possèdent des limites d'utilisation. La simple addition mathématique des effets de deux ou plusieurs agents est une mauvaise façon de calculer l'effet additif prévu afin de conclure s'il y a synergie ou antagonisme. Cette mauvaise habitude de représenter l'additivité comme étant $0.5 + 0.5 = 1$, la synergie, $0.5 + 0.5 > 1$, et l'antagonisme, $0.5 + 0.5 < 1$, demeure une méthode biaisée dans des études de combinaison, surtout avec des agents qui causent des effets inhibiteurs. Par exemple, dans une situation où deux agents produisent chacun un effet inhibiteur de 60%, l'effet additif prévu serait de 120%, ce qui est théoriquement incorrect puisque le pourcentage maximal d'inhibition est de 100%.

L'utilisation de la simple addition mathématique pour évaluer l'effet associatif d'agents dans des études de combinaison demeure l'erreur la plus fréquente. La difficulté à prédire la synergie, l'additivité et l'antagonisme relate de plusieurs éléments. Certains facteurs doivent être considérés lors de l'analyse de l'interaction entre deux agents. Chaque agent mis en combinaison possède des effets intrinsèques propres, voire sa propre puissance et sa courbe dose-réponse spécifique. Ces effets sont également associés à aux constantes d'affinité (par exemple, les constantes K_m et K_i) et d'efficacité (par exemple, le V_{max}). De plus, la complexité biologique intrinsèque des agents ne permet habituellement pas d'obtenir ces informations, surtout lorsque des facteurs de régulation (par exemple, les rétroactions négatives), voire les facteurs spatial, temporel et microenvironnemental (par exemple, la température, la force ionique et le pH) sont impliqués. Il existe d'autres méthodes mathématiques pour déterminer la synergie, l'additivité et l'antagonisme lors de combinaisons d'agents thérapeutiques comme la méthode du produit fractionnel ou la méthode de l'isobologramme classique. Ces méthodes de quantification, bien qu'utilisées par plusieurs auteurs, comportent des limites d'utilisation. Le problème majeur de la méthode du produit fractionnel est que celle-ci ne tient pas compte de la forme (hyperbolique ou sigmoïdale) des courbes dose-réponse. De plus, cette méthode n'est pas applicable dans un système d'ordre >1 , ni dans un système d'agents mutuellement exclusifs (agents avec des modes d'action similaires). La méthode du produit fractionnel n'est valide que dans un des quatre modèles des systèmes enzymatiques importants pour des études de combinaison d'agents (Tableau 1.10.1). La méthode de l'isobologramme classique comporte également des limites d'utilisation. Elle n'est pas applicable pour des systèmes d'agents mutuellement non exclusifs (agents avec des modes d'action distincts) d'ordre 1 ou d'ordre >1 . Une analyse de deux agents mutuellement non exclusifs avec cette méthode ne fait que surestimer la synergie ou sous-estimer l'antagonisme, puisqu'on assume que les deux agents possèdent le même mécanisme d'action. La méthode de l'isobologramme classique n'est valide que dans deux des quatre modèles des systèmes enzymatiques (Tableau 1.10.1).

Ce projet de recherche comporte trois études de combinaisons d'agents où nous avons évalué le type d'interaction (additivité, synergie ou antagonisme) des agents immunosuppresseurs avec le principe de l'effet médian et la méthode d'index de combinaison (CI). Cette méthode demeure la meilleure procédure puisqu'elle tient compte de plusieurs paramètres biochimiques, en plus de ne pas posséder de limites d'utilisation; elle est valide dans les quatre systèmes enzymatiques (Tableau 1.10.1) (Chou et al., 1983; 1984). C'est par une approche physicochimique impliquant la loi de l'action de masse que l'auteur a introduit le principe de l'effet médian et le concept d'index de combinaison. La loi de l'action de masse est une prémisse de base qui inclut la dynamique de l'équilibre chimique, le phénomène d'absorption physique de Langmuir, la théorie des récepteurs biologiques et la cinétique enzymatique. Contrairement aux approches empiriques et statistiques, cette approche physicochimique permet d'élaborer des modèles bien définis pour des déviations mathématiques lors d'analyses de dose-effet en biologie. Chou (1974; 1976; 1977; 1980) a dérivé et rapporté plusieurs centaines d'équations pour différents substrats, produits, types d'inhibition ou séquences de réaction, dont l'équation de l'effet médian par l'utilisation de la méthode d'induction et de déduction mathématique. Les auteurs ont ensuite démontré que l'équation de l'effet médian peut être facilement utilisée pour dériver quatre grandes équations en biochimie (Figure 1.10.1): l'équation de Michaelis-Menten (une équation du ratio de la catalyse enzymatique); 2) l'équation de Hill (représentant la liaison des ligands primaires aux récepteurs biologiques, par exemple l'interaction oxygène-hémoglobine); 3) l'équation d'Hendersen-Hasselbach (définissant le pH d'une solution en terme de pKa d'un acide faible et le logarithme du ratio de la concentration d'une base conjuguée sur la concentration d'un acide faible); et 4) l'équation de Scatchard (représentant l'association et la dissociation du ligand à son récepteur) (Chou, 1977; 1987; Chou et al., 1991).

Le principe de l'effet médian comprend une équation et un graphique. L'équation générale de la relation dose-effet a été dérivée par l'induction mathématique

et avec l'utilisation d'une centaine de modèles de cinétique enzymatique. La corrélation dose et effet se fait dans la forme la plus simple :

$$fa/fu = (D/Dm)^m,$$

où D représente la dose de l'agent; Dm , la dose de l'effet médian (c'est à dire la dose causant 50% de l'efficacité); fa , la fraction affectée par la dose; fu , la fraction non affectée ($fu = 1 - fa$); et m , la sigmoïdité de la courbe dose-effet (étant déterminée par la pente du graphique). Le graphique de l'effet médian a été introduit en 1976 (Chou, 1976; 1991), et il est basé sur la forme logarithmique de l'équation de l'effet médian:

$$\log (fa/fu) = m \log (D) - m \log (Dm)$$

Or, cette équation a la forme d'une ligne droite et la pente de la droite donne la valeur m , tandis que les valeurs en abscisse donnent les valeurs du $\log (Dm)$. Une corrélation linéaire du coefficient r du graphique représente une bonne correspondance des valeurs selon l'équation de l'effet médian. Habituellement, une bonne corrélation dose-effet est représentée par un $r > 0.96$ (pour les systèmes de récepteurs ou d'enzymes), un $r > 0.90$ (pour un système de culture cellulaire), et un $r > 0.85$ (pour des systèmes animaux). Le principe de l'index de combinaison inclut l'équation qui est basée sur l'équation de multiples agents-effets, introduite par Chou et al. (1977), ainsi que le graphique en forme d'isobogramme (démontrant des doses équipotentes pour un effet donné). L'équation de combinaison ne détermine que l'effet additif, et non la synergie ou l'antagonisme. Par ailleurs, les auteurs définissent la synergie comme étant un effet plus grand que l'effet additif, et l'antagonisme comme un effet moindre que l'effet additif. Chou et al. (1983) ont proposé la signification CI égale à 1 ($CI = 1$) comme étant un effet additif. Ainsi, selon l'équation de concentration de deux agents, on obtient la forme:

$$CI = (D)_1 / (D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2,$$

pour des agents mutuellement exclusifs, c'est-à-dire des agents qui ont des modes d'action semblables ou similaires, et la forme:

$$CI = (D)_1/(D_x)_1 + (D)_2/(D_x)_2 + (D)_1 (D)_2/(D_x)_1 (D_x)_2,$$

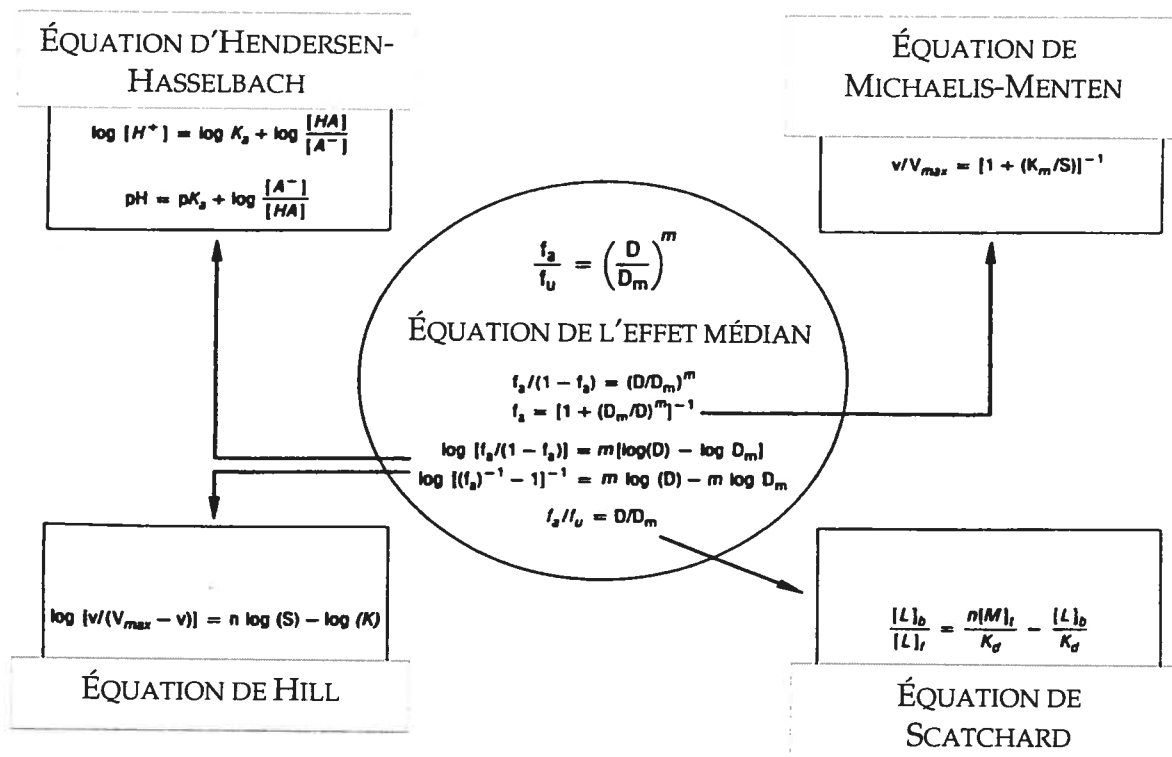
pour des agents mutuellement non exclusifs, c'est-à-dire des agents avec des modes d'action totalement indépendants et différents. Dans ces équations, l'agent 1 $(D)_1$ et l'agent 2 $(D)_2$ mis en combinaison inhibent un certain pourcentage (X%) dans l'expérience. Le pourcentage d'inhibition ainsi observé expérimentalement n'est pas un chiffre entier mais plutôt une fraction décimale, et les paramètres $(D_x)_1$ et $(D_x)_2$ représentent respectivement les doses de l'agent 1 seul et l'agent 2 seul, causant l'effet inhibiteur X% (Chou et al., 1984; 1987; Chou, 1991). C'est en 1981 que le concept d'index de combinaison, incluant l'équation et le graphique *Fa-CI*, a été introduit (Chou et al., 1981; 1983; 1984; 1987). Depuis 1985, les équations, le principe de l'effet médian et l'index de combinaison ont été utilisés dans plusieurs études d'évaluation d'agents anticancéreux et immunosuppresseurs qui ont été publiées dans des centaines de journaux biomédicaux à l'échelle internationale. Néanmoins, il semble qu'en général, cette méthode a perdu un peu de son intérêt scientifique auprès des groupes dans le domaine de la transplantation. Actuellement, seulement quelques groupes de recherche en transplantation d'organes utilisent mordicus le principe de l'effet médian et l'index de combinaison pour évaluer des nouvelles combinaisons d'immunosuppresseurs, malgré la popularité de cette méthode auprès des groupes de recherche en oncologie.

TABLEAU 1.10.1. Comparaison de la validité des différentes méthodes d'analyse d'une combinaison d'agents thérapeutiques

	Nature des courbes dose-réponse et de l'interaction des agents			
	Agents mutuellement exclusifs (mécanismes d'action similaires)		Agents mutuellement non-exclusifs (mécanismes d'action différents)	
	1 ^{er} Ordre	> 1 ^{er} Ordre	1 ^{er} Ordre	> 1 ^{er} Ordre
La méthode du produit fractionnel (Webb, 1963)	Non	Non	Oui	Non
La méthode de l'isobologramme classique (Loewe, 1957)	Oui	Oui	Non	Non
L'équation de multiples agents-effets (Chou et Talalay, 1984)	Oui	Oui	Oui	Oui

Tiré de Chou et al., 1991.

FIGURE 1.10.1. Relation entre l'équation de l'effet médian et d'autres équations biochimiques majeures



Tiré de Chou et al., 1991.

1.11 BUT DU PROJET DE RECHERCHE

Le rejet aigu d'allogreffe est un phénomène immunologique qui survient dans plus de 60% des cas de transplantation d'organes, et il demeure l'une des principales causes d'échec. Un traitement immunosuppresseur s'avère primordial afin de préserver l'intégrité fonctionnelle et morphologique du greffon. Une combinaison appropriée de faibles doses de différents agents immunosuppresseurs est une stratégie visant à augmenter la survie de l'allogreffe tout en minimisant les effets secondaires dose-dépendants de chaque agent. Depuis la découverte de la cyclosporine, il y eut une explosion dans la recherche, le développement et la découverte de nouvelles molécules non-biologiques ou biologiques avec des propriétés immunosuppressives. Cette thèse de doctorat comporte quatre études originales évaluant l'effet de nouvelles combinaisons d'agents immunosuppresseurs, incluant trois récentes molécules, dans des tests de prolifération et des modèles de transplantation allogénique d'organes vascularisés chez le rat: 1) la thérapie combinée du sirolimus et du mycophénolate mofétil à prévenir contre le rejet aigu d'allogreffes cardiaques, pancréatiques et rénales; 2) la combinaison du malononitrilamide FK778 et du tacrolimus dans des tests de prolifération et dans la prévention du rejet aigu d'allogreffe rénale; 3) la thérapie combinée du WAY-160279, un antagoniste de VLA-4, et du sirolimus à prévenir et à renverser le rejet aigu d'allogreffe cardiaque; et 4) la combinaison du rPSGL-Ig, un inhibiteur de la P-sélectine, et d'un immunosuppresseur conventionnel (sirolimus, tacrolimus, mycophénolate mofétil ou cyclosporine) dans la prévention du rejet aigu d'allogreffe rénale. L'objectif global de ce projet de recherche consiste à évaluer l'effet de ces nouveaux traitements de combinaison qui introduisent une nouvelle molécule immunosuppressive administrée de manière concomitante avec un agent immunosuppresseur conventionnel à faible poids moléculaire, dans la prolongation de la survie d'allogreffe vascularisée chez le rat, voire dans la prévention du rejet aigu.

La thérapie combinée du sirolimus et du mycophénolate mofétil

Dans un premier temps, nous voulons évaluer la thérapie combinée du sirolimus et du mycophénolate mofétil à prévenir contre le rejet aigu d'allogreffe vascularisée. Les objectifs précis de cette première étude sont: 1) d'évaluer l'effet d'une combinaison à faibles doses de sirolimus (0.2 -- 1.2 mg/kg/jour, po) et de mycophénolate mofétil (10 – 20 mg/kg/jour, po), à prolonger la survie des allogreffes cardiaques (BN → LEW), pancréatiques (BN → LEW) et rénales (BUF → WFu) chez le rat, comparativement aux groupes témoins respectifs qui ne reçoivent aucun traitement immunosuppresseur; 2) de vérifier l'effet de la combinaison à faibles doses du sirolimus et du mycophénolate mofétil, à renverser le rejet aigu installé dans un modèle d'allogreffe cardiaque (BN → LEW) chez le rat; et 3) d'évaluer le type d'interaction (synergique, additive ou antagoniste) entre le sirolimus et le mycophénolate mofétil à prévenir contre le rejet aigu d'allogreffes cardiaques, pancréatiques et rénales chez le rat, à l'aide du principe de l'effet médian et de la méthode d'index de combinaison.

La thérapie combinée du malononitrilamide FK778 et du tacrolimus

Dans un second temps, nous voulons vérifier l'effet *in vitro* et *in vivo* de la thérapie combinée du malononitrilamide FK778 et du tacrolimus comme traitement immunosuppresseur. Les objectifs initiaux de cette seconde étude sont: 1) d'évaluer les effets du FK778, du tacrolimus et de la combinaison FK778 et tacrolimus à inhiber la prolifération des lymphocytes T, chez la souris, le primate non-humain et l'humain, à l'aide du test de prolifération; 2) d'évaluer les effets du FK778, du tacrolimus et de la combinaison FK778 et tacrolimus à inhiber la prolifération des lymphocytes B, chez la souris, le primate non-humain et l'humain, à l'aide du test de prolifération; 3) de vérifier le type d'interaction (synergique, additive ou antagoniste) entre le FK778 et le tacrolimus à inhiber la prolifération des lymphocytes T et B chez la souris, le primate non-humain et l'humain, à l'aide du principe de l'effet médian et de la méthode d'index de combinaison; 4) d'évaluer la thérapie combinée du FK778 (10 mg/kg/jour) et du tacrolimus (1 mg/kg/jour) à prolonger la survie des allogreffes rénales (ACI → LEW)

chez le rat, comparativement au groupe témoin non-traité; 5) de déterminer le type d'interaction (synergique, additive ou antagoniste) entre le FK778 et le tacrolimus à prévenir contre le rejet aigu d'allogreffes rénales chez le rat, à l'aide du principe de l'effet médian et de la méthode d'index de combinaison. Suite aux résultats intéressants obtenus, nous avons effectué des études supplémentaires pour évaluer davantage cette combinaison d'immunosuppresseurs et les objectifs précis en sont: 6) de comparer l'effet d'un traitement combiné de FK778 et de tacrolimus, où les deux agents sont administrés de façon concomitante (combinaison conventionnelle) *versus* un traitement combiné de FK778 et de tacrolimus, où l'administration du FK778 est retardée au jour 7 posttransplantation (combinaison FK778-retardée), dans la prolongation de la survie des allogreffes rénales (ACI → LEW) chez le rat; 7) de comparer les coupes histologiques traitées à l'éosine/hématoxyline des allogreffes traitées avec la combinaison conventionnelle de FK778 et de tacrolimus *versus* celles des allogreffes traitées avec la combinaison FK778-retardée; 8) de comparer l'effet de la combinaison conventionnelle *versus* la combinaison FK778-retardée sur la fonction rénale, à l'aide de l'évaluation des taux de créatinine plasmatique; et 9) de comparer l'effet de la combinaison conventionnelle *versus* la combinaison FK778-retardée sur la production d'anticorps IgG spécifiques contre le donneur ACI, à l'aide de la technique de cytométrie en flux.

La thérapie combinée de la molécule WAY-160279 et du sirolimus

Dans un troisième temps, nous voulons évaluer la thérapie combinée du WAY-160279, un nouvel antagoniste de VLA-4, et du sirolimus à prévenir contre le rejet aigu d'allogreffe vascularisée. Les objectifs précis de cette troisième étude sont: 1) d'évaluer l'effet d'une combinaison à des doses sous-thérapeutiques de la molécule WAY-160279 (10 -- 50 mg/kg/jour, po) et du sirolimus (0.02 – 0.08 mg/kg/jour, iv), à prolonger la survie des allogreffes cardiaques (BN → LEW) chez le rat, comparativement au groupe témoin non-traité; 2) d'évaluer l'effet d'une combinaison à des doses sous-thérapeutiques de la molécule WAY-160279 (10 -- 50 mg/kg/jour, po) et du sirolimus

(0.02 – 0.08 mg/kg/jour, iv), à renverser le rejet aigu installé dans les allogreffes cardiaques (BN → LEW) chez le rat; 3) de déterminer le type d'interaction (synergique, additive ou antagoniste) entre l'agent WAY-160279 et le sirolimus à prévenir et à traiter le rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez le rat, à l'aide du principe de l'effet médian et de la méthode d'index de combinaison.

La thérapie combinée du rPSGL-Ig et des immunosuppresseurs conventionnels

Dans un quatrième temps, nous voulons évaluer la thérapie combinée du rPSGL-Ig, un nouvel inhibiteur de la P-sélectine, et d'un agent immunosuppresseur conventionnel (sirolimus, tacrolimus, mycophénolate mofétil ou cyclosporine) à prévenir contre le rejet aigu d'allogreffe vascularisée. Les objectifs précis de cette quatrième étude sont: 1) d'évaluer l'effet d'une combinaison à des faibles doses de rPSGL-Ig (100 µg en prétraitement et 100 µg à la reperfusion, iv) et de sirolimus (0.8 mg/kg/jour, po), de tacrolimus (1 mg/kg/jour, po), de mycophénolate mofétil (10 mg/kg/jour, po) ou de cyclosporine (4 mg/kg/jour), à prolonger la survie des allogreffes rénales (ACI → LEW) chez le rat, comparativement au groupe témoin non-traité; 2) de comparer les coupes histologiques traitées à l'éosine/hématoxyline des allogreffes traitées avec la combinaison du rPSGL-Ig et de la cyclosporine *versus* les allogreffes non-traitées.

Les résultats de ces études de combinaison d'agents immunosuppresseurs chez les rongeurs permettront d'identifier des nouvelles thérapies anti-rejet potentielles et favorables, et de justifier l'évaluation de ces combinaisons en étude préclinique chez le primate non-humain, voire éventuellement chez l'humain, en étude clinique de phase I.

SECOND CHAPITRE

MANUSCRIT I:

SYNERGISTIC EFFECTS OF MYCOPHENOLATE MOFETIL AND SIROLIMUS IN PREVENTION OF ACUTE HEART, PANCREAS AND KIDNEY ALLOGRAFT REJECTION AND IN REVERSAL OF ONGOING HEART ALLOGRAFT REJECTION IN THE RAT

Vu MD, Qi S, Xu D, Wu J, Peng J, Daloze P, Sehgal S, Leduc B, Chen H.

Transplantation 1998, 66 (12): 1575-80

Transplantation®

ARTICLES

SYNERGISTIC EFFECTS OF MYCOPHENOLATE MOFETIL AND SIROLIMUS IN PREVENTION OF ACUTE HEART, PANCREAS, AND KIDNEY ALLOGRAFT REJECTION AND IN REVERSAL OF ONGOING HEART ALLOGRAFT REJECTION IN THE RAT^{1,2}

MINH DIEM VU,^{3,6} SHIJIE QI,³ DASHENG XU,³ JIANGPING WU,⁴ JUNZHENG PENG,³ PIERRE DALOZE,³ SUREN SEHGAL,⁵ BERNARD LEDUC,⁵ AND HUIFANG CHEN^{3,7}

Laboratories of Experimental Surgery and Transplantation Immunology, Research Center of CHUM, Notre-Dame Hospital, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada; and Wyeth-Ayerst Research, USA & Canada

Background. The effect of mycophenolate mofetil (MMF) and sirolimus (rapamycin, RAPA) mono- and combination-therapy was examined in prevention of acute heart, pancreas, and kidney allograft rejection and in reversal of ongoing heart allograft rejection in the rat.

Methods. Both drugs were administered orally for up to 30 days. Eleven groups (n=6) were involved in the first part of the heart allografting model. Brown Norway (RT1ⁿ) to Lewis (RT1^l) combination was used in the heart and pancreas transplantation models, whereas Buffalo (RT1^b) to Wistar Furth (RT1^w) was used in the kidney transplantation model.

Results. The naive control group showed a mean survival time of 6.5±0.6 days. There were graded dose-responses to monotherapy of MMF 10 and 20 mg/kg/day (12.5±2.6 days; 19.3±9.0 days) and RAPA 0.2, 0.4, 0.8, and 1.8 mg/kg/day (19.2±2.0 days; 30.0±7.3 days; 50.8±12.5 days; 51.2±2.6 days), respectively (P=0.001). Results with the combined use of drugs indicate that a synergistic or very strong synergistic interaction was produced when compared with monotherapy of MMF or RAPA: MMF 10 mg/kg/day+RAPA 0.2 mg/kg/day (52.7±5.7 days, combination index [CI]=0.189), MMF 20 mg/kg/day+RAPA 0.2 mg/kg/day (57.7±5.7 days, CI=0.084), MMF 10 mg/kg/day+RAPA 0.4 mg/kg/day (50.2±13.5 days, CI=0.453), and MMF 20 mg/kg/day+RAPA 0.4 mg/kg/day (51.5±6.8 days, CI=0.439), respec-

tively. These results were repeatable in the prevention of acute pancreas and kidney allograft rejection in the rat. In the second part of the study of reversal of ongoing acute heart allograft rejection model, the combined treatment of MMF 10 mg/kg/day+RAPA 0.2 mg/kg/day (35.5±16.0 days, CI=0.794) and MMF 20 mg/kg/day+RAPA 0.2 mg/kg/day (57.2±4.7 days, CI=0.310) represented synergistic interaction compared with monotherapy of MMF or RAPA.

Conclusions. Concomitant therapy of MMF and RAPA produces a synergistic effect in prevention of heart, pancreas, and kidney allograft rejection and in reversal of ongoing heart allograft rejection in the rat.

Rejection, infection, or toxic complications of immunosuppressive treatment are the main causes of graft loss in clinical transplantation. Cyclosporine (CsA*)-based immunosuppression has substantially improved allograft survival in organ transplantation (1-7). Since its clinical use, it has become the immunosuppressive drug of choice after transplantation and in autoimmune diseases (1, 8, 9). However, the use of CsA is limited because it causes dose-dependent hepatotoxicity and nephrotoxicity (10-12), the mechanisms of which remain incompletely understood. Although today's immunosuppressive protocols have resulted in unprecedented success in solid-organ transplantation, a variety of new agents are being investigated that may provide a greater efficacy and/or a more favorable side-effect profile than those of current regimens.

Mycophenolate mofetil (MMF) is a semisynthetic derivative of the antimetabolic acid produced by the fungus *Penicillium*. MMF is a potent, noncompetitive, reversible inhibitor of the enzyme inosine monophosphate dehydrogenase. This enzyme catalyzes the conversion of inosine to guanine monophosphate, which is required for purine synthesis during cell division. Because activated T and B cells are dependent on de novo purine synthesis, MMF may be a potent

¹ Presented at the 17th Annual Meeting of the American Society of Transplant Physicians, May 9-13, 1998, Chicago, IL.

² This work was supported in part by Roche Bioscience, USA; Wyeth-Ayerst Research USA & Canada; and Research Center of CHUM, University of Montreal.

³ Laboratory of Experimental Surgery, Research Center of CHUM, Notre-Dame Hospital, University of Montreal.

⁴ Laboratory of Transplantation Immunology, Research Center of CHUM, Notre-Dame Hospital, University of Montreal.

⁵ Department of Discovery Research, Wyeth-Ayerst Research USA & Canada.

⁶ M. D. Vu is supported by FRSQ-FCAR-Santé studentship.

⁷ Address correspondence to: Huifang Chen, M.D., Ph.D., Laboratory of Experimental Surgery, Research Center of CHUM, Room Y1611, Notre-Dame Hospital, University of Montreal, 1560 Sherbrooke Street East, Montreal, Quebec, H2L 4M1, Canada.

* Abbreviations: BN, Brown Norway; BUF, Buffalo; CI, combination index; CsA, cyclosporine; LEW, Lewis; MST, mean survival time; MMF, mycophenolate mofetil; RAPA, rapamycin; WFu, Wistar-Furth.

immunosuppressant in organ transplantation. MMF has been shown to prevent acute graft rejection both in experimental and in clinical organ transplantation (13-17).

Sirolimus (rapamycin, RAPA) is a macrolide antibiotic, produced by *Streptomyces hygroscopicus* isolated from an Easter Island soil sample in 1975 (18-20) that was originally described as an antifungal agent. However, interest in this molecule was rekindled with the discovery of FK506, which displays many structural similarities with RAPA. RAPA is also a strong immunosuppressant that is 10- to 100-fold greater than CsA in preventing rejection of vascularized allografts in animal models (21-25). It is also effective in alleviating ongoing rejection of the kidney, pancreas, and heart allografts in the rat (25, 26). RAPA has a strong antiproliferative effect on T cells stimulated via the T-cell receptor/CD³ pathway. We have reported previously that RAPA also acts directly on B cells and effectively inhibits Ig production in vitro and in vivo (27, 28). An interesting feature of RAPA is that its short-term administration can induce long-term vascularized allograft survival in the rodent, with the surviving organs including heart, kidney, pancreas, and small bowel (26, 29). We have also shown that RAPA-induced long-term allograft tolerance depends on the persistence of the alloantigen (30). In spite of its chemical similarity with FK506, RAPA has been shown to act by a different intracellular pathway, which is calcium-independent.

The strategy of multiple immunosuppressive therapy for organ transplantation is to enhance therapeutic efficacy while minimizing the toxicity of individual drugs used in the regimen. Results from preclinical studies predict that the use of a selected combination of immunosuppressants in patients will be more efficacious with less side-effects. The aim of this study was to evaluate the combined effect of MMF and RAPA in the prevention of acute allograft and in the reversal of ongoing acute rejection in different organ transplantation models in the rat.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Adult (9-11 weeks old) male Brown Norway (BN, RT1ⁿ), Lewis (LEW, RT1^b), Buffalo (BUF, RT1^b) and Wistar-Furth (Wfu, RT1ⁿ) rats were obtained from Harlan Sprague-Dawley (Indianapolis, IN). The rats were housed in controlled light/dark cycles and allowed free access to water and rat chow.

Drugs. MMF was donated in powder form by Roche Bioscience (Palo Alto, CA) and prepared by suspension in carboxymethyl cellulose with carbopol gel at 20 mg/ml. Oral formula of RAPA was obtained from Wyeth-Ayerst Research (Rouses Point, NY). Both MMF and RAPA were administered daily by gavage for 30 days.

Heterotopic heart transplantation. Heterotopic heart transplants were placed intra-abdominally by a method described by Ono and Lindsey (31), with some modifications (26, 30). End-to-side anastomoses of the donor aorta to the recipient aorta and the donor pulmonary artery to the recipient vena cava were performed. The function of the transplanted heart was evaluated by daily abdominal palpation. The time of rejection was defined as the last day of palpable cardiac contraction, and the rejection was confirmed histologically after laparotomy. Animals that lost palpable activity of the graft within 3 days after surgery were classified as technical failures (less than 3%) and were omitted from data analysis.

Pancreas transplantation. The surgical procedure was described by Lee et al. (32) and was subsequently modified by our laboratory (24, 26). The donor and diabetic recipient (streptozocin-induced diabetes) were given 5% glucose and 0.9% saline ad libitum 24 hr before surgery. The pancreaticoduodenal graft was harvested from the do-

nor rat, with a segment of aorta containing the celiac and superior mesenteric arteries supplying the graft and with a segment of portal vein containing the venous drainage from the graft. The graft was transplanted into the recipient rat by performing end-to-side vascular anastomoses with continuous 10-0 nylon sutures between the graft aorta segment and the host aorta, and between the graft portal vein segment and host inferior vena cava. The proximal end of the graft duodenum was closed and the distal end was anastomosed to the side of the third portion of the host duodenum, using a degradable stent inserted into each stump to provide an intestinal splint. Lactated Ringer's solution at 4°C was used for cooling the graft. Graft cold ischemia time was less than 45 min. Blood glucose was measured twice a week. The time of rejection was defined as the day when the level of blood glucose was beyond 14 mmol/L for at least 2 days. Animals that died within 3 days postoperatively (less than 5%) were not included in the analysis.

Kidney transplantation. Orthotopic kidney transplantation was performed by a modified method of Fisher and Lee (33). The left kidney was perfused through the aorta with 4°C heparinized saline and harvested en bloc, after transecting the ureter, the renal artery close to aorta, and the renal vein near the vena cava. The kidney was preserved in 4°C Ringer's lactate solution for less than 30 min. The recipient was anesthetized and the left nephrectomy was performed after transecting the ureter, renal artery, and vein. End-to-end anastomoses of donor and recipient renal arteries and veins were performed using 10-0 nylon suture. After releasing the vascular clamps, an end-to-end anastomosis of donor and recipient ureters was made using 10-0 nylon suture. Before closing the abdomen, the native right kidney of the recipient was removed. The time of rejection was defined as the last day before the death of the recipients. Animals that died within 3 days after transplantation (less than 5%) were excluded from analysis.

DESIGN OF EXPERIMENTS

Prevention of acute rejection. LEW recipient rats received BN heart or pancreas grafts. Wfu recipient rats received BUF kidney graft and were treated with MMF and/or RAPA daily at different doses by gavage from day 1 posttransplantation for 30 days. Eleven groups (n=6) were involved in the cardiac allograft model (Table 1), 7 groups (n≥6) in the pancreatic model (Table 3), and 7 groups (n≥6) in the renal model (Table 4).

Reversal of ongoing acute cardiac rejection. LEW recipient rats received BN heart, and were treated with MMF and/or RAPA daily by gavage at different doses from day 4 posttransplantation. Seven groups (n=6) were involved in this part of study (Table 2).

DATA ANALYSIS

Heart, pancreas, and kidney allograft survivals are presented as a mean survival time (MST ± SD), with comparison among groups performed by Gehan's survival test. The median-effect principle (34-36) is based on the premise that the effect of each agent is related to its dose and, therefore, be calculated using the following equation:

$$(fa/fu) = (D/D_m)^m \quad (1)$$

where fa and fu represent the fractions of the system that are affected (% inhibition or rather days of survival beyond controls) and unaffected ($1 - fa$), respectively, by the drug at dose D . Full protection ($fa = 1$) is defined as at least a 60-day survival of allograft. D_m is the dose required for 50% inhibition (ED_{50}), the median-effect; m is a coefficient that describes the sigmoidicity of the dose-effect curve. The interaction between two drugs, synergism, summation, or antagonism is assessed by the combination index (CI),

$$CI_x = \frac{D_1 \text{ combined}}{D_1 \text{ alone}} + \frac{D_2 \text{ combined}}{D_2 \text{ alone}} + \frac{(D_1 \text{ combined})(D_2 \text{ combined})}{(D_1 \text{ alone})(D_2 \text{ alone})} \quad (2)$$

TABLE 1. Effect of MMF and RAPA in prevention of acute heart allograft rejection in the rat (BN → LEW)

Group ^a	Survival ^b (days)	MST±SD (days)	P	CI ^c
Control	6,6,6,7,7,7	6.5±0.6	—	—
MMF (10 mg)	10,10,11,13,15,16	12.5±2.6	0.001	—
MMF (20 mg)	11,13,16,18,22,36	19.3±9.0	0.001	—
RAPA (0.2 mg)	16,18,19,20,20,22	19.2±2.0	0.001	—
RAPA (0.4 mg)	26,26,26,26,32,44	30.0±7.3	0.001	—
RAPA (0.8 mg)	27,48,54,57,59,60	50.8±12.5	0.001	—
RAPA (1.2 mg)	47,51,51,51,52,55	51.2±2.6	0.001	—
MMF (10 mg)+RAPA (0.2 mg)	49,49,49,49,60,60	52.7±5.7	0.001	0.189
MMF (20 mg)+RAPA (0.2 mg)	46,60,60,60,60,60	57.7±5.7	0.001	0.084
MMF (10 mg)+RAPA (0.4 mg)	26,44,51,60,60,60	50.2±13.5	0.001	0.453
MMF (20 mg)+RAPA (0.4 mg)	46,46,47,50,60,60	51.5±6.8	0.001	0.439

^a MMF and RAPA were administered by gavage for 30 days from day 1 after transplantation.

^b Arbitrarily evaluated up to a maximum of 60 days.

^c CI values for MMF and RAPA interaction calculated as shown in statistical analysis.

TABLE 2. Effect of MMF and RAPA in reversal of ongoing acute cardiac allograft rejection in the rat (BN → LEW)

Group ^a	Survival ^b (days)	MST±SD (days)	P	CI ^c
Control	6,6,6,7,7,7	6.5±0.6	—	—
MMF (10 mg)	10,10,11,11,11,12	10.8±0.8	0.001	—
MMF (20 mg)	14,20,26,27,28,31	24.3±6.2	0.001	—
RAPA (0.2 mg)	10,10,10,11,13,16	11.7±2.4	0.001	—
RAPA (0.4 mg)	19,19,24,26,37,38	27.2±8.5	0.001	—
MMF (10 mg)+RAPA (0.2 mg)	22,22,22,39,50,58	35.5±16.0	0.001	0.794
MMF (20 mg)+RAPA (0.2 mg)	49,54,60,60,60,60	57.2±4.7	0.001	0.310

^a MMF and RAPA were administered by gavage for 30 days from day 4 after transplantation.

^b Arbitrarily evaluated up to a maximum of 60 days.

^c CI values for MMF and RAPA interaction calculated as shown in statistical analysis.

where D_1 combined and D_2 combined represent the amount of drug 1 and drug 2, respectively. D_1 and D_2 each display $\pm\%$ inhibition for the mutually exclusive case where both drugs have different modes of action. According to Chou's interpretation, CI values less than 1.0 (<1) suggest synergism, whereas those equal to 1.0 (=1) indicate summation, and those above 1.0 (>1) show antagonism. A computer software program was used to assess the dose-effect parameters (Dm , m , and r) and CI values (Calculusyn, Biosoft).

RESULTS

Synergistic effect of MMF and RAPA in prevention of acute heart allograft rejection and in reversal of ongoing acute heart allograft rejection. In untreated LEW recipient rats receiving BN heart allograft, a MST of 6.5 ± 0.6 days was observed. In contrast, LEW recipients treated with a low dose of MMF 10 mg/kg/day or MMF 20 mg/kg/day orally for up to 30 days had a significantly prolonged BN heart allograft survival with a MST of 12.5 ± 2.6 and 19.3 ± 9.0 days, respectively, compared with naive controls. There was a graded dose-response to RAPA-treated groups with a MST of 19.2 ± 2.0 days (RAPA 0.2 mg/kg/day; $P=0.001$), 30.0 ± 7.3 days (RAPA 0.4 mg/kg/day; $P=0.001$), 50.8 ± 12.5 days (RAPA 0.8 mg/kg/day; $P=0.001$), and 51.2 ± 2.6 days (RAPA 1.2 mg/kg/day; $P=0.001$). Furthermore, concomitant use of a low dose MMF with a low dose of RAPA produced synergistic or very strong synergistic interactions when compared with single MMF or RAPA use only, namely, MMF 10 mg/kg/day+RAPA 0.2 mg/kg/day (52.7 ± 5.7 days; $CI=0.189$); MMF 20 mg/kg/day+RAPA 0.2 mg/kg/day (57.7 ± 5.7 days; $CI=0.084$); MMF 10 mg/kg+RAPA 0.4 mg/kg (50.2 ± 13.5 days; $CI=0.453$); and MMF 20 mg/kg/day+RAPA 0.4 mg/kg/day (51.5 ± 6.8 days; $CI=0.439$, Table 1).

The results of graft survival after treatment with a low dose of MMF and/or RAPA starting from day 4 after transplantation until day 34 are detailed in Table 2. Moderate synergism was observed in the combined use of MMF (10 mg/kg/day) and RAPA (0.2 mg/kg/day), which maintained the BN allograft survival for a MST of 35.5 ± 16.0 days ($P=0.001$; $CI=0.794$) when compared with MMF or RAPA used alone. Synergistic effect of MMF (20 mg/kg/day) and RAPA (0.2 mg/kg/day) was also observed with a MST of 57.2 ± 4.7 days ($P=0.001$; $CI=0.310$) compared with single agent use.

Synergistic interaction of MMF and RAPA in prolongation of pancreas allograft. Untreated LEW recipient rats rejected BN pancreatic grafts within a MST of 9.2 ± 2.6 days as diagnosed by the appearance of blood glucose beyond 14 mmol/L (Table 3). When a low dose of MMF (10 mg/kg/day) and RAPA (0.2 mg/kg/day) were combined therapy for 30 days, nearly additive interaction was observed with a MST of 17.2 ± 2.9 days ($P=0.001$, $CI=1.108$). Furthermore, combined use of MMF (20 mg/kg/day) and RAPA (0.2 mg/kg/day) produced moderate synergism when compared with MMF (20 mg/kg/day) and RAPA (0.2 mg/kg/day) used alone ($P=0.001$; $CI=0.726$).

Synergistic effect of MMF and RAPA in prolongation of renal allograft. Untreated WFU recipients of BUF kidney allografts displayed a MST of 7.7 ± 0.8 days (Table 4). In contrast, recipients treated with a low dose of MMF (10 mg/kg/day) and RAPA (0.2 mg/kg/day) survived for 59.0 ± 2.4 days, presenting very strong synergism ($P=0.001$; $CI=0.001$) compared with MMF or RAPA used alone. Furthermore, combined therapy of MMF (20 mg/kg/day) with RAPA (0.2 mg/kg/day) also produced very strong synergism, with a MST

TABLE 3. Effect of MMF and RAPA in prevention of acute pancreas allograft rejection in the rat (BN → LEW)

Group ^a	Survival ^b (days)	MST±SD (days)	P	CI ^c
Control	7,7,7,10,11,13	9.2±2.6	—	—
MMF (10 mg)	10,12,12,13,15,18	13.3±2.8	0.02	—
MMF (20 mg)	14,16,17,19,24,35	20.8±7.7	0.005	—
RAPA (0.2 mg)	12,14,15,15,15,16	14.5±1.4	0.001	—
RAPA (0.4 mg)	11,12,14,16,23,28	17.3±6.7	0.02	—
MMF (10 mg)+RAPA (0.2 mg)	14,15,16,17,19,21	17.0±2.6	0.001	1.108
MMF (20 mg)+RAPA (0.2 mg)	19,19,19,23,32,32,40	26.3±8.4	0.001	0.726

^a MMF and RAPA were administered by gavage for 30 days from day 1 after transplantation.

^b Arbitrarily evaluated up to a maximum of 60 days.

^c CI values for MMF and RAPA interaction calculated as shown in statistical analysis.

TABLE 4. Effect of MMF and RAPA in prevention of acute kidney allograft rejection in the rat (BUF → WFU)

Group ^a	Survival ^b (days)	MST±SD (days)	P	CI ^c
Control	7,7,7,8,8,9	7.7±0.8	—	—
MMF (10 mg)	7,12,13,14,16,19	13.5±4.0	0.006	—
MMF (20 mg)	11,15,16,20,23,26	18.5±5.5	0.001	—
RAPA (0.2 mg)	8,8,9,9,10,12,14	10.0±2.2	0.03	—
RAPA (0.4 mg)	7,10,10,11,16,18,29	14.4±7.5	0.05	—
MMF (10 mg)+RAPA (0.2 mg)	54,60,60,60,60,60	59.0±2.4	0.001	0.001
MMF (20 mg)+RAPA (0.2 mg)	57,59,59,60,60,60	59.2±1.2	0.001	0.001

^a MMF and RAPA were administered by gavage for 30 days from day 1 after transplantation.

^b Arbitrarily evaluated up to a maximum of 60 days.

^c CI values for MMF and RAPA interaction calculated as shown in statistical analysis.

of 59.2±1.2 days ($P=0.001$; CI=0.001) compared with single immunosuppressant use only.

DISCUSSION

The present experiments examined the effects of MMF and RAPA mono- and combination-therapy in prolongation of heart, pancreas, and kidney allograft survival in the rat. In animal models, MMF prolonged allograft survival in mice (37), rats (13), dogs (38), and monkeys (13). In the dog kidney transplantation model, combined therapy with MMF, CsA, and corticosteroids (MMF 20 mg/kg/day, CsA 5 mg/kg/day, and methylprednisolone 0.1 mg/kg/day) was more effective in preventing graft rejection than either MMF alone or CsA plus methylprednisolone (39). Furthermore, acute renal allograft rejection in dogs could be reversed with higher doses of MMF (80 mg/kg twice daily) for 3 consecutive days (14).

RAPA used as a sole immunosuppressant has been shown to prolong allograft survival in different species (40). However, RAPA given alone can induce significant side effects in several nonrodent species, including primates and pigs (40–42), and has been shown to be particularly toxic in dogs (43, 44). The toxic effects in dogs included fever, anorexia, vomiting, severe weight loss, gastrointestinal ulceration and vasculitis, extreme lethargy, and death, with RAPA at a dose as low as 0.25 mg/kg/day. Ochiai et al. (43) reported that CsA at a dose of 2.5 mg/kg/day both reduced RAPA's toxic effects in dogs and improved renal allograft survival. Hartner et al. (45) reported that combined use of low dose RAPA, antilymphocyte serum, and CsA could induce long-term renal graft survival in dogs without serious RAPA-induced side effects. Drug combination therapy permitted reduction of immunosuppressive drug doses from 10- to 200-fold, and to optimize efficacy while minimizing toxicity (46, 47). Both MMF and

RAPA are potent immunosuppressants but with different side effects. MMF could induce leukopenia, upper gastrointestinal disorders, and cytomegalovirus disease (48). RAPA-associated toxicities include thrombocytopenia, leukopenia, and an increase in cholesterol and triglyceride levels (49).

The potential benefits suggest that by combination therapy of MMF and RAPA can prevent allograft rejection in clinic organ transplantation. Because both MMF and RAPA are highly bioavailable as oral preparations, an outpatient anti-rejection therapy may be initiated and the cost of hospitalization, morbidity, and risks associated with parenteral anti-rejection agents are avoid. Furthermore, the potentially lethal infection complications and myelosuppression secondary to high-dose corticosteroids and anti-lymphocyte agents are expected to be minimum.

In this study, subtherapeutic doses were selected as 10 to 20 mg/kg for MMF and 0.2 to 0.4 mg/kg for RAPA. The two-drug combinations displayed moderate synergism to very strong synergism (CI values of 0.001–0.794) in three different models. The synergistic interactions of MMF and RAPA may be explained by their different biological activities. MMF, the morpholinoethyl ester of mycophenolic acid, is a potent, uncompetitive, reversible inhibition of eukaryotic inosine monophosphate dehydrogenase, the rate-limiting enzyme in the de novo synthesis of purine (50–52). MMF selectively blocks proliferation of T and B lymphocytes, which require a full functioning de novo pathway for purine synthesis. It also inhibits antibody formation and generation of cytotoxic T cells and has been shown to inhibit humoral responses in vitro and in vivo (53, 54). MMF differs in its mode of action from CsA, tacrolimus, and RAPA in that it does not affect cytokine production or the more proximal events after antigen recognition. Although RAPA has been

shown to block P^{70S6K} and modulate the stability of some cytokine mRNAs during the G₀-G₁ stage, RAPA's major inhibitory effects are on the proliferation of T cell cycle at mid to late G₁. RAPA does not inhibit Ca⁺⁺-dependent lymphokine gene expression, but impairs the response of T cells to growth-promoting lymphokines (55).

In conclusion, our present results show that concomitant therapy of low doses of MMF and RAPA produces synergistic effects in prevention of heart, pancreas, and kidney allograft rejection and in reversal of ongoing heart allograft rejection in the rat. These results warrant further investigation in the combination of MMF and RAPA in preclinical and clinical organ transplantation.

Acknowledgments. The authors thank Roche Bioscience and Wyeth-Ayerst Research for supporting the grant and for the supply of MMF and RAPA, and for helpful discussions. We are grateful to Ms. Carmen Rodriguez for help in the preparation of the manuscript.

REFERENCES

- Kahan BD. Cyclosporine. *N Engl J Med* 1989; 321: 1725.
- Borel JF. Cyclosporine: basic science summary. *Transplant Proc* 1988; 20 (suppl 2): 722.
- European Multicentre Trial Group. Cyclosporin in cadaveric renal transplantation: one year follow-up of a multicentre trial. *Lancet* 1983; 2: 986.
- Canadian Multicentre Transplant Group. A randomized clinical trial of cyclosporine in cadaveric renal transplantation. *N Engl J Med* 1983; 309: 809.
- Bennett WM, Pulliam JP. Cyclosporine nephrotoxicity. *Ann Intern Med* 1983; 99: 851.
- Ryffel B, Foxwell BM, Gee A, Greiner G, Woerly G, Mihatsch MJ. Cyclosporine—relationship of side effects to mode of action. *Transplantation* 1988; 46: 905.
- Kumar MSA, White AG, Alex G, et al. Correlation of blood levels and tissue level of cyclosporine with the histologic features of cyclosporin toxicity. *Transplant Proc* 1988; 20: 407.
- Tilney NL, Milford EL, Ajuro LL, et al. Experience with cyclosporine and steroids in clinical renal transplantation. *Ann Surg* 1984; 200: 605.
- Kahan BD. Cyclosporine: a powerful addition to the immunosuppressive armamentarium. *Am J Kidney Dis* 1984; 3: 444.
- Sturrock ND, Lang CC, Struthers AD. Cyclosporin-induced nephrotoxicity and hypertension. *Br J Hosp Med* 1992; 48: 483.
- Leaker B, Cairns HS. Clinical aspects of cyclosporin nephrotoxicity. *Br J Hosp Med* 1994; 52: 529.
- Mason J. The effect of cyclosporin on renal function. *J Autoimmun* 1992; 5 (suppl A): 349.
- Morris RE, Wang J, Blum JR, et al. Immunosuppressive effects of morpholinoethyl ester of mycophenolic acid (RS-61443) in rat and nonhuman primate recipients of heart allografts. *Transplant Proc* 1991; 23 (suppl 2): 19.
- Platz KP, Bechstein WO, Eckhoff DE, Susuki Y, Sollinger HW. RS-61443 reverses acute rejection in dogs. *Surgery* 1991; 110: 736.
- The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group. A blinded, randomized clinical trial of mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in cadaveric renal transplantation. *Transplantation* 1996; 61: 1029.
- Sievers TM, Rossi SJ, Ghobrial RM, et al. Mycophenolate mofetil. *Pharmacotherapy* 1997; 17: 1178.
- Hodge EE. The role of mycophenolate mofetil in clinical renal transplantation. *World J Urol* 1996; 14: 249.
- Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22, 989), a new anti-fungal antibiotic: I. Taxonomy of producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)* 1975; 28: 721.
- Sehgal SN, Baker H, Vezina C. Rapamycin (AY-22, 989), a new anti-fungal antibiotic: II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)* 1975; 28: 727.
- Baker H, Sidorowicz A, Sehgal SN, Vezina C. Rapamycin (AY-22, 989), a new anti-fungal antibiotic: III. In vitro and in vivo evaluation. *J Antibiot (Tokyo)* 1978; 31: 539.
- Calne RY, Collier DSJ, Lim S, et al. Rapamycin for immunosuppression in organ allografting. *Lancet* 1989; 2: 227.
- Morris RE, Meiser M. Identification of a new pharmacologic action for an old compound. *Med Sci Res* 1989; 17: 609.
- Stepkowski SH, Chen H, Daloze P, Kahan B. Rapamycin, a new potent immunosuppressive drug for vascularized heart, kidney, and small bowel allografts. *Transplantation* 1991; 52: 22.
- Chen HF, Wu JP, Luo HY, Daloze PM. The immunosuppressive effect of rapamycin on pancreaticoduodenal transplants in the rat. *Transplant Proc* 1991; 23: 2239.
- Chen H, Wu J, Luo H, Daloze P. Reversal of ongoing rejection of allografts by rapamycin. *Transplant Proc* 1991; 23: 2241.
- Chen H, Wu J, Xu D, Luo H, Daloze P. Reversal of ongoing heart, kidney, and pancreas allograft rejection and suppression of accelerated heart allograft rejection in the rat by rapamycin. *Transplantation* 1993; 56: 651.
- Luo H, Chen H, Daloze P, Chang J, Wu J. Inhibition of in vitro immunoglobulin production by rapamycin. *Transplantation* 1992; 53: 1071.
- Chen H, Luo H, Daloze P, et al. Long-term in vivo effects of rapamycin on humoral and cellular immune responses in the rat. *Immunobiology* 1993; 188: 303.
- Chen H, Wu J, Xu D, Aboujaoude M, Daloze P. The effect of rapamycin on orthotopic small bowel transplantation in the rat. *Transplant Proc* 1992; 24: 1157.
- Chen H, Luo H, Daloze P, Xu D, Wu J. Rapamycin-induced long-term allograft survival depends on persistence of alloantigen. *J Immunol* 1994; 152: 3107.
- Ono K, Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1969; 517: 225.
- Lee S, Scott M, McMacedo AR. Pancreaticoduodenal transplantation in the rat: a technique update. *Transplantation* 1986; 42: 327.
- Fisher B, Lee S. Microvascular surgical techniques in research: with special reference to renal transplantation in the rat. *Surgery* 1965; 58: 904.
- Chou TC. The median-effect principle and combination index for quantitation of synergism and antagonism. In: Chou TC, Rideout D, eds. *Synergism and antagonism in chemotherapy*. San Diego: Academic Press, 1991: 61.
- Stepkowski SM, Napoli KL, Wang ME, Qu X, Chou TC, Kahan BD. Effects of the pharmacokinetic interaction between orally administered sirolimus and cyclosporin on the synergistic prolongation of heart allograft survival in rats. *Transplantation* 1996; 62: 986.
- Vu MD, Qi S, Xu D, et al. Tacrolimus (FK506) and sirolimus (rapamycin) in combination are not antagonistic but produce extended graft survival in cardiac transplantation in the rat. *Transplantation* 1997; 64: 1853.
- Morris RE, Hoyt EG, Murphy MP, Eugui EM, Allison AC. Mycophenolic acid morpholinoethylester (RS-61443) is a new immunosuppressant that prevents and halts heart allograft rejection by selective inhibition of T- and B-cell purine synthesis. *Transplant Proc* 1990; 22: 1659.
- Bechstein WO, Schilling M, Steele DM, Hullet DA, Sollinger HW. RS-61443/cyclosporine combination therapy prolongs canine liver allograft survival. *Transplant Proc* 1993; 25 (Pt 1): 702.

39. Platz KP, Sollinger HW, Hullett DA, Eckhoff DE, Eugui EM, Allison AC. RS-61443—a new, potent immunosuppressive agent. *Transplantation* 1991; 51: 27.
40. Morris RE. Rapamycins: antifungal, antitumor, antiproliferative, and immunosuppressive macrolide. *Transplant Rev* 1992; 6: 39.
41. Collier DStJ, Calne RY, Pollard SG, Friend PJ, Thiru S. Rapamycin in experimental renal allografts in primates. *Transplant Proc* 1991; 23: 2246.
42. Almond PS, Moss A, Nakhleh RE, et al. Rapamycin: immunosuppression, hyporesponsiveness, and side effects in porcine renal allograft model. *Transplantation* 1993; 56: 275.
43. Ochiai T, Gunji Y, Nagata M, Akitoshi K, Asano T, Isono K. Effects of rapamycin in experimental organ allografting. *Transplantation* 1993; 56: 15.
44. Knight R, Ferrareso M, Serino F, Katz S, Lewis R, Kahan BD. Low-dose rapamycin potentiates the effects of subtherapeutic doses of cyclosporine to prolong renal allograft survival in the mongrel canine model. *Transplantation* 1993; 55: 947.
45. Hartner WC, Van der Werf WJ, Lodge JPA, et al. Effect of rapamycin on renal allograft survival in canine recipients treated with antilymphocyte serum, donor bone marrow, and cyclosporine. *Transplantation* 1995; 60: 1347.
46. Vathsala A, Chou TC, Kahan BD. Analysis of interactions of immunosuppressive drugs with cyclosporine to inhibit DNA proliferation. *Transplantation* 1990; 49: 463.
47. Kahan BD. Immunosuppressive therapy. *Curr Opin Immunol* 1992; 4: 553.
48. Pirsch JD, Sollinger HW. Mycophenolate mofetil—clinical and experimental experience. *Ther Drug Monit* 1996; 18: 357.
49. Kelly PA, Gruber SA, Behbod F, Kahan BD. Sirolimus, a new, potent immunosuppressive agent. *Pharmacotherapy* 1997; 17: 1148.
50. Sollinger HW, Belzer FO, Deierhoi MH, et al. RS-61443 (Mycophenolate Mofetil)—a multicenter study for refractory kidney transplant rejection. *Ann Surg* 1992; 216: 513.
51. Laskow DA, Deierhoi MH, Hudson SH, Orr CL, Curtis JJ, Diethelm AG. The incidence of subsequent acute rejection following the treatment of refractory renal allograft rejection with mycophenolate mofetil (RS-61443). *Transplantation* 1994; 57: 640.
52. Lee WA, Gu L, Miksztal AR, Chu N, Leung K, Nelson PH. Bioavailability improvement of mycophenolic acid through amino ester derivatization. *Pharm Res* 1990; 7: 161.
53. Eugui EM, Almquist SJ, Muller CD, Allison AC. Lymphocyte-selective cytostatic and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in vitro: role of deoxyguanosine nucleotide depletion. *Scand J Immunol* 1991; 33: 161.
54. Eugui EM, Mirkovich A, Allison AC. Lymphocyte-selective antiproliferative and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in mice. *Scand J Immunol* 1991; 33: 175.
55. Sehgal SN, Molnar-Kimber K, Ocain TD, Weichman BM. Rapamycin: a novel immunosuppressive macrolide. *Med Res Rev* 1994; 14: 1.

Received 1 May 1998

Accepted 10 July 1998

TROISIÈME CHAPITRE

MANUSCRIT II:

**THE COMBINATION THERAPY OF MALONONITRILAMIDE FK778 WITH
TACROLIMUS ON CELL PROLIFERATION ASSAYS, AND IN RATS RECEIVING
RENAL ALLOGRAFTS**

**Minh Diem Vu, Shijie Qi, Xiang Wang, Wenlei Jiang, Anlun Ma, Dasheng Xu,
Ihor Bekersky, William E. Fitzsimmons, Jiangping Wu, Huifang Chen**

Transplantation 2003; 75 (9):1455-9

COMBINATION THERAPY OF MALONONITRILAMIDE FK778 WITH TACROLIMUS ON CELL PROLIFERATION ASSAYS AND IN RATS RECEIVING RENAL ALLOGRAFTS^{1,2}

MINH DIEM VU,^{4,5,7} SHIJIE QI,⁵ XIANG WANG,⁵ WENLEI JIANG,⁵ ANLUN MA,⁵ DASHENG XU,⁵ IHOR BEKERSKY,⁶ WILLIAM E. FITZSIMMONS,⁶ JIANGPING WU,^{3,7} AND HUIFANG CHEN^{3,5,8}

Background. Malononitrilamide FK778, an analogue of leflunomide's active metabolite, is a promising novel small molecule with immunosuppressive and immunomodulatory properties. In this study, we evaluated the ability of combination therapy of FK778 with tacrolimus to inhibit lymphocyte proliferation and to prevent acute allograft rejection.

Methods. Proliferation assay was used to evaluate the effect of FK778 plus tacrolimus on murine splenocytes, monkey lymphocytes, and human peripheral blood mononuclear cells, after activation with T or B cell-specific mitogens. A rat kidney transplantation model was used to evaluate the ability of FK778 combined with tacrolimus to prolong allograft survival. Median-effect principle and combination index (CI) were used to determine synergism, summation, or antagonism.

Results. A total of 58 combinations of FK778 plus tacrolimus were evaluated. Of the combinations tested, 82.8% (24/29) produced additive to synergistic effects in B cells, whereas 79.3% (23/29) produced moderate antagonistic effects in T cells. A concomitant 14-day therapy of FK778 (10 mg/kg/day) and tacrolimus (1 mg/kg/day) synergistically prolonged renal allograft survival to 25.5 ± 5.9 days (CI=0.458). However, when addition of FK778 to tacrolimus therapy was delayed to day 7 after transplantation, a strong synergism was obtained (mean survival time= 74.9 ± 14.8 days, CI<0.001).

Conclusions. This study demonstrates that the combination of FK778 with tacrolimus in vitro produces synergistic inhibition on B-cell proliferation but not on T cell proliferation in mice, nonhuman primates, and humans. When the addition of FK778 treatment

was delayed to day 7 after transplantation, a strong synergism was produced in prolongation of renal allograft survival in the rat.

Although the introduction of cyclosporine as an immunosuppressant has significantly prolonged allograft survival of patients, chronic use can cause toxicities that interfere with the proper function of vital organs and can reduce patient quality of life. Given that most transplant recipients will receive immunosuppression for the rest of their lives, better therapies are essential.

Malononitrilamide (MNA) FK778, also known as MNA 715 or HMR 1715, is a new analogue of leflunomide's active metabolite. After administration, the pro-drug leflunomide is rapidly converted to its active opened-ring metabolite, A77 1726 [2-cyano-3-hydroxy-N-(4-trifluoromethylphenyl)butenamide]. Structure-activity relationship studies have reported that chemical modifications of A77 1726 can increase lipophilicity, binding affinity, and immunosuppressive properties (1,2). FK778 [2-cyano-3-hydroxy-N-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-6-heptynamide ($C_{15}H_{11}F_3N_2O_2$)] was synthesized by substituting a methyl group with $CH_3-CH_2-C \equiv CH$, in the R4 position of the A77 1726 molecule (3). Leflunomide and A77 1726 have been demonstrated to possess potent antiproliferative and anti-inflammatory properties and to inhibit proliferation and function of T and B cells; they have been extensively studied in animal models of autoimmune diseases and solid organ transplantation (4-6). Although the mechanism of action of leflunomide is ambiguous, several studies have shown that inhibition of de novo pyrimidine biosynthesis by the blockade of the pivotal enzyme dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) and the inhibition of tyrosine kinase activities are the major actions (7-12). Recently, it has been reported that leflunomide possesses immune suppressive potency in renal and liver transplant recipients. However, a wide interpatient range in the terminal half-life of leflunomide's active metabolite was seen (13). Despite the promising profile of leflunomide, it has a long half-life (15-18 days) and requires frequent dose adjustment in transplant recipients. The MNAs have been under intense investigation as antirejection drugs. Studies in rodents and dogs have reported a potential role of MNAs in prevention of allograft and xenograft rejection (14-17).

Tacrolimus (TAC), also known as FK506, is a potent immunosuppressant that is 10- to 100-fold more efficacious than cyclosporine in preventing acute rejection of vascularized allografts (18,19). TAC is a calcineurin inhibitor that prevents T lymphocyte immune responses through the blockade of the calcium-dependent signaling pathway, a step immediately before the induction of interleukin (IL)-2. Therefore, TAC inhibits IL-2 gene transcription. The initial reports

¹ This work was supported by Fujisawa Healthcare, Inc.

² Presented at the 19th International Congress of the Transplantation Society, Miami, FL, August 25 to 30, 2002.

³ These authors contributed equally.

⁴ M.D.V. is an FRSQ-FCAR-Santé scholarship recipient of the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche.

⁵ Laboratory of Experimental Surgery, Research Center of Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Notre-Dame Hospital, Montreal, Quebec, Canada.

⁶ Fujisawa Healthcare, Inc., Deerfield, IL.

⁷ Laboratory of Transplantation Immunology, Research Center of Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Notre-Dame Hospital, Montreal, Quebec, Canada.

⁸ Address correspondence to: HuiFang Chen, M.D., Ph.D., Laboratory of Experimental Surgery, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Notre-Dame Hospital, 2099, Alexandre-de-Seve, Room Y1611, Montreal, Quebec, H2L 2W5, Canada. E-mail: hui.fang.chen@umontreal.ca.

Received 3 October 2002.

Revision Requested 6 November 2002. Accepted 19 December 2002.

DOI: 10.1097/01.TP.0000058811.25785.F4

of successful clinical use of TAC in prevention and reversal of allograft rejection raised great interest in its potential for becoming a gold standard. Recent reports of clinical trials continue to support the high effectiveness and safety of TAC-based multiple regimens in liver transplantation (20,21).

The strategy of multiple immunosuppressive therapies using a proper combination of low-dose antirejection drugs is to enhance therapeutic efficacy while minimizing the toxicity of individual drugs used in the regimen. The aim of this study was to evaluate the effect of combination therapy of FK778 with TAC in cell proliferation assays in mice, nonhuman primates, and humans to determine whether combination therapy could prevent acute renal allograft rejection in rats.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

FK778 and TAC were provided by Fujisawa Healthcare, Inc. (Deerfield, IL) and dissolved in dimethyl sulfate (ICN Biomedicals, Inc., Aurora, OH) and ethanol, respectively, for in vitro use. Concanavalin A, lipopolysaccharide, and phytohemagglutinin were purchased from Sigma (St. Louis, MO). *Staphylococcus aureus* Cowan I was obtained from Calbiochem (La Jolla, CA). Human recombinant IL-2 was purchased from Genzyme (Boston, MA). RPMI 1640 was supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and 1% L-glutamine, penicillin, and streptomycin. For in vivo use, FK778 was dissolved in a vehicle containing distilled water, mannitol, and L-lysine; TAC was dissolved in distilled water.

Animals

Adult female CD1 mice and adult male Lewis (LEW; RT1¹) rats were purchased from Charles River (St. Constant, Quebec, Canada). Adult male ACI (RT1^a) rats were obtained from Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN). Adult male Vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops*), weighing 4 to 6 kg, were obtained from Caribbean Primates, Ltd. (St. Kitts, Eastern Caribbean). Rodents were maintained on controlled light/dark cycles in a pathogen-free environment and were allowed free access to water and chow. Primates were housed in individual cages with unlimited access to water and food. All procedures on animal were performed in accordance with the *Manual of Experimental Animal Care Guidelines, 2nd Edition, 1993*.

Proliferation Assay

Mouse splenocytes and monkey lymphocytes were isolated from the spleen and lymph nodes, respectively. Splenocytes were depleted of red blood cells after an incubation with 0.84% ammonium chloride at 37°C for 5 min. Human peripheral blood mononuclear cells were isolated from heparinized blood of healthy donors using the Lympholyte-H gradient density solution (Cedarlane, Hornby, ON). As T cell-selective mitogens, concanavalin A (2 µg/mL) and phytohemagglutinin (2 µg/mL) were used to activate murine T cells and monkey and human T cells, respectively. To activate B lymphocytes, lipopolysaccharide (2 µg/mL) and *Staphylococcus aureus* Cowan I (1:27,000 dilution) plus IL-2 (20 U/mL) were added to mouse and to monkey and human cell cultures, respectively. Cells were cultured in 96-well flat-bottomed plates in complete RPMI 1640; FK778, TAC, or both were added immediately. Cells were cultured at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. All doses of FK778 or TAC contained a nontoxic concentration of dimethyl sulfate (<0.125%) or ethanol (<0.05%) as their respective vehicle. Samples were in triplicate. Experiments were repeated three times. Results presented are from representative experiments.

[³H]Thymidine Uptake

[³H]thymidine uptake was used as an indicator for cell proliferation. T and B cells were cultured for 48 and 72 hr, respectively, and

then pulsed for 16 to 20 hr with 1 µCi per well of [³H]thymidine. The amount of [³H]thymidine incorporation was determined by β-scintillation counting.

Kidney Transplantation

As previously described, kidney transplantation was performed following a method of the author (21). The time of rejection was defined as the last day before the death or sacrifice of recipients. Animals that died within 3 days after transplantation (less than 5%) were excluded from analysis.

Data Analysis of Drug Interaction

Drug efficacy was determined as the percentage of inhibition of cell proliferation. The percentage of inhibition was calculated according to the mean of the count per minute (CPM) values (triplicate) and following the subsequent equation:

$$\% \text{ of inhibition} = 100 -$$

$$\left[\frac{(\text{CPM of experimental group} - \text{CPM of background})}{(\text{CPM of control group} - \text{CPM of background})} \times 100 \right] \quad (1)$$

As previously described, the median-effect principle and the combination index (CI) for mutually exclusive cases were used to verify the interaction between FK778 and TAC, which is the most relevant mathematical method for this application (21,22). A CI less than 1.0 (<1), equal to 1.0 (=1), or higher than 1.0 (>1) suggests synergism, summation, or antagonism, respectively. A computer software program was used to assess dose-effect parameters (*Dm*, *m*, and *r*) and CI values (Calcsyn, Biosoft).

Statistical Analysis

For statistical analysis, recipient survival rates were presented as mean survival time (MST) and standard deviation (MST ± SD) with comparison among groups performed by Gehan's survival test.

RESULTS

Antiproliferative Properties of FK778 and TAC

Dose-response curves (more than four doses) of FK778 (1.23–300 µM) and TAC (0.09375–6 nM) showed good dose-dependent correlations in mouse splenocytes, monkey lymphocytes, and human peripheral blood mononuclear cells activated with T- or B-selective mitogens (*r* = 0.911–0.996, data not shown). Furthermore, in terms of molarity, our results also suggest that TAC is 10⁴- to 10⁶-fold more potent than FK778 (data not shown).

The Sensitivity of T and B Cells to FK778 Is Species Specific

It has been recently suggested by Gregory et al. (23) that the responsiveness of MNA is species specific. In our study, we evaluated the sensitivity of mouse, nonhuman primate, and human T and B cells to FK778 by comparing the *Dm* (dose required for 50% inhibition or median-effect) of FK778 in each species. The *Dm* of FK778 in mouse, Vervet monkey, and human T cells were 17.7, 31.7, and 68.4 µM, respectively. In B cells, *Dm* were 24.8 µM in mice, 57.1 µM in Vervet monkeys, and 60.0 µM in humans. These results confirm that the sensitivity of T and B cells to FK778 is species specific: mouse > Vervet monkey ≥ human. Our data are consistent with reports that rodent cells are the most sensitive to MNAs and human cells are the least sensitive (13,23).

Synergistic Effects of the Combination of FK778 with TAC to Inhibit B-Cell Proliferation.

We first investigated the effect of FK778 combined with TAC on B lymphocytes in mice, nonhuman primates, and humans. A total of 29 combinations with various doses of FK778 and TAC were evaluated. Twenty-four combinations showed additive to synergistic antiproliferative effects ($CI \leq 1$) in B cells (Table 1): 8 combinations of 11 showed synergistic to strong synergistic effects ($CI = 0.05-0.43$) in mice; 9 combinations of 9 demonstrated additive to synergistic effects ($CI = 0.454-1.032$) in monkeys; and 7 combinations of 9 showed additive to synergistic effects ($CI = 0.544-1.117$) in humans. Our overall results suggest that the combination of FK778 with TAC produced synergistic effects in the blockade of B-cell proliferation in mice, nonhuman primates, and humans.

Tendency of Antagonistic Effects of the Combination of FK778 with TAC to Inhibit T-Cell Proliferation

Secondly, we investigated FK778 combined with TAC on T lymphocytes in mice, nonhuman primates, and humans. In con-

trast to our results with B cells, we found that the combination of FK778 with TAC produced slight to strong antagonistic effects in the blockade of T-cell proliferation. A total of 29 combinations with various doses of FK778 and TAC were assessed. Twenty-three combinations showed antagonistic antiproliferative effects ($CI > 1$) in T cells (Table 2): 11 combinations of 11 produced antagonistic to strong antagonistic effects ($CI = 2.786$ to >10) in mice; 6 combinations of 9 showed slight to strong antagonistic effects ($CI = 1.176-7.804$) in monkeys; and 6 combinations of 9 demonstrated slight to strong antagonistic effects ($CI = 1.027$ to >10) in humans. However, in humans, CI values fluctuate from 1.027 to more than 10, with four points at CI almost equal to 1.0 but 5 points at CI less than 1. Although the tendency is antagonistic, we think it is difficult to say definitively whether a combined use of FK778 and TAC is antagonistic in humans or rather produces nearly additive or antagonistic effects.

Synergistic Effects of the Combination Therapy of FK778 with TAC in Prevention of Acute Renal Allograft Rejection

In addition to proliferation assays, we further evaluated whether the combination therapy of FK778 with TAC would

TABLE 1. Synergistic antiproliferative effect of the combination therapy of FK778 with tacrolimus in activated B lymphocytes

Groups ^a	Inhibition	CI ^b
Mouse B-cell groups		
1) LPS	—	—
2) FK778 11.1 μ M + TAC 0.048 nM	0.73%	>10
3) FK778 1.23 μ M + TAC 0.048 nM	19.6%	0.252
4) FK778 11.1 μ M + TAC 0.024 nM	43.2%	0.050
5) FK778 3.7 μ M + TAC 0.024	37.6%	0.047
6) FK778 1.23 μ M + TAC 0.024 nM	34.0%	0.052
7) FK778 11.1 μ M + TAC 1.2 nM	43.5%	0.081
8) FK778 3.7 μ M + TAC 1.2 nM	32.9%	0.289
9) FK778 1.23 μ M + TAC 1.2 nM	43.1%	0.047
10) FK778 11.1 μ M + TAC 6 nM	40.0%	0.430
11) FK778 3.7 μ M + TAC 6 nM	30.5%	1.988
12) FK778 1.23 μ M + TAC 6 nM	21.9%	>10
Vervet monkey B-cell groups		
1) SAC + IL-2	—	—
2) FK778 50 μ M + TAC 0.375 nM	50.3%	1.032
3) FK778 25 μ M + TAC 0.375 nM	39.3%	0.506
4) FK778 12.5 μ M + TAC 0.375 nM	47.6%	0.619
5) FK778 50 μ M + TAC 0.75 nM	61.6%	0.768
6) FK778 25 μ M + TAC 0.75 nM	50.2%	0.688
7) FK778 12.5 μ M + TAC 0.75 nM	42.1%	0.619
8) FK778 50 μ M + TAC 1.5 nM	71.2%	0.602
9) FK778 25 μ M + TAC 1.5 nM	66.1%	0.458
10) FK778 12.5 μ M + TAC 1.5 nM	57.8%	0.454
Human B-cell groups		
1) SAC + IL-2	—	—
2) FK778 50 μ M + TAC 0.375 nM	84.7%	0.544
3) FK778 25 μ M + TAC 0.375 nM	62.7%	0.769
4) FK778 12.5 μ M + TAC 0.375 nM	54.0%	0.593
5) FK778 50 μ M + TAC 0.75 nM	83.7%	0.693
6) FK778 25 μ M + TAC 0.75 nM	67.5%	0.835
7) FK778 12.5 μ M + TAC 0.75 nM	43.8%	1.117
8) FK778 50 μ M + TAC 1.5 nM	88.9%	0.662
9) FK778 25 μ M + TAC 1.5 nM	66.3%	1.251
10) FK778 12.5 μ M + TAC 1.5 nM	48.0%	1.518

^a TAC and FK778 were dissolved in nontoxic concentrations of ethanol and DMSO, respectively.

^b $CI < 1$, synergism; $CI = 1$, summation; $CI > 1$, antagonism.

SAC, *Staphylococcus aureus* Cowan I; DMSO, dimethyl sulfate.

TABLE 2. Antagonistic antiproliferative effect of the combination therapy of FK778 with tacrolimus in activated T lymphocytes

Groups ^a	Inhibition	CI
Mouse T-cell groups		
1) Con A	—	—
2) FK778 15 μ M + TAC 0.019 nM	40.7%	2.786
3) FK778 10 μ M + TAC 0.019 nM	9.8%	>10
4) FK778 15 μ M + TAC 0.039 nM	34.9%	6.832
5) FK778 10 μ M + TAC 0.039 nM	14.9%	>10
6) FK778 7.5 μ M + TAC 0.039 nM	4.3%	>10
7) FK778 15 μ M + TAC 0.078 nM	46.5%	5.800
8) FK778 10 μ M + TAC 0.078 nM	42.9%	5.948
9) FK778 7.5 μ M + TAC 0.078 nM	35.3%	8.839
10) FK778 15 μ M + TAC 0.156 nM	56.1%	5.767
11) FK778 10 μ M + TAC 0.156 nM	57.3%	4.430
12) FK778 7.5 μ M + TAC 0.156 nM	50.6%	6.096
Vervet monkey T-cell groups		
1) PHA	—	—
2) FK778 20 μ M + TAC 0.1875 nM	84.7%	1.786
3) FK778 10 μ M + TAC 0.1875 nM	62.7%	3.007
4) FK778 5 μ M + TAC 0.1875 nM	54.0%	7.804
5) FK778 20 μ M + TAC 0.375 nM	83.7%	1.176
6) FK778 10 μ M + TAC 0.375 nM	67.5%	1.663
7) FK778 5 μ M + TAC 0.375 nM	43.8%	1.381
8) FK778 20 μ M + TAC 0.75 nM	88.9%	0.654
9) FK778 10 μ M + TAC 0.75 nM	66.3%	0.456
10) FK778 5 μ M + TAC 0.75 nM	48.0%	0.953
Human T-cell groups		
1) PHA	—	—
2) FK778 100 μ M + TAC 0.09375 nM	63.9%	1.06
3) FK778 50 μ M + TAC 0.09375 nM	0 %	>10
4) FK778 25 μ M + TAC 0.09375 nM	0 %	>10
5) FK778 100 μ M + TAC 0.1875 nM	76.9%	1.055
6) FK778 50 μ M + TAC 0.1875 nM	7.1%	2.678
7) FK778 25 μ M + TAC 0.1875 nM	0 %	>10
8) FK778 100 μ M + TAC 0.375 nM	88.1%	1.027
9) FK778 50 μ M + TAC 0.375 nM	45.8%	1.189
10) FK778 25 μ M + TAC 0.375 nM	8.3%	3.332

^a TAC and FK778 were dissolved in nontoxic concentrations of ethanol and DMSO, respectively.

Con A, concanavalin A; PHA, phytohemagglutinin.

prevent allograft acute rejection and prolong recipient survival in the renal transplantation model in the rat, using a strong allogeneic combination of ACI to LEW rats. In untreated LEW recipient rats receiving ACI kidney allografts, an MST of 7.3 ± 0.5 days was observed (Table 3). LEW recipients orally treated for 14 days with a low dose of FK778 (10 mg/kg/day) or TAC (1 mg/kg/day) had significantly prolonged survival, with respective MST of 16.8 ± 3.1 days ($P < 0.01$) and 10.5 ± 1.4 days ($P < 0.01$) compared with naïve controls. There were graded dose responses to FK778 or TAC (data not shown). In recipients concomitantly treated with a low dose of FK778 (10 mg/kg/day, from days 1 to 14) and a low dose of TAC (1 mg/kg/day, from days 1 to 14), a synergistic interaction was seen when compared with single-drug treatment of FK778 or TAC (MST = 25.5 ± 5.9 days, CI = 0.458).

Interestingly, when FK778 treatment was not administered at the same time as TAC during the first week after transplantation, but was delayed to day 7 after transplantation, recipient survival became significantly prolonged when compared with the conventional combined group ($P < 0.001$). In the FK778-delayed combined group, the use of FK778 10 mg/kg per day (from days 8 to 14) + TAC 1 mg/kg per day (from days 1 to 14) extended rat survival to 74.9 ± 14.8 days and produced a strong synergistic interaction (CI < 0.001). Moreover, we evaluated the effect of FK778 pretreatment followed by TAC monotherapy. A synergistic effect was observed in the FK778-pretreated combined group, in which LEW recipients were pretreated with FK778 (10 mg/kg/day, from days -7 to -1) and then received monotherapy with TAC (1 mg/kg/day, from days 1 to 14) (MST = 45.1 ± 34.7 days; CI = 0.004). Although the MST of the FK778-pretreated combined group was higher than that of the conventional combined group, the difference was not significant (MST = 45.1 ± 34.7 days vs. MST = 25.5 ± 5.9 days, $P = 0.197$). This therapy did not produce a stable effect; it produced a large variation in recipient survival time (from 10 to 98 days), with 50% of recipients dying within 21 days after transplantation.

DISCUSSION

The mechanism of action of leflunomide and MNAs is quite complex and not fully understood. In the mid-1990s, a report first described the mechanism of action of leflunomide as the

inhibition of protein kinase activities, including Src family (p56^{lck} and p59^{lyn})-mediated protein tyrosine phosphorylation (10). Then, other groups reported the blockade of pyrimidine synthesis through DHODH inhibition as the mechanism of action of leflunomide (7-9). A study conducted by Elder et al. (12) showed that A77 1726 affects murine T cells through both biochemical mechanisms. At a low dose of A77 1726 (up to $12.5 \mu\text{M}$), the addition of uridine can completely reverse the inhibition of proliferation by CTLA-4, whereas at higher concentrations of A77 1726, uridine did not completely reverse the inhibition and did not reverse the inhibition caused by $150 \mu\text{M}$ A77 1726 to any significant extent. This suggests that at low dose, MNAs affect murine T cells through the blockade of pyrimidine synthesis and not likely through inhibition of tyrosine kinase activity. In our study, we used low concentrations of FK778 ($< 15 \mu\text{M}$) in all combinations of FK778 and TAC in mice. The fact that FK778 combined with TAC produced synergistic antiproliferative effects in B cells but has an antagonistic tendency in T-cell proliferation leads us to believe that another molecular pathway, which is sensitive to FK778, TAC, or both, could be implicated in B-cell activation and proliferation but not (or to a lesser extent) in T cells. Recently, leflunomide has been reported to inhibit Bruton's tyrosine kinase, an enzyme that plays a pivotal role in B lymphocyte proliferation, but has less implication in T cells (24,25).

Similar to Morris' report, we observed species specificity of T- and B-cell sensitivity to FK778. This could be explained by a study of Knecht et al. that showed that the differences among cells from different species in their susceptibility to isoxazole and cinchoninic acid derivatives (eg, leflunomide) are based on different affinities for the drugs by the enzyme DHODH (26).

According to our data and the literature, we wanted to verify whether a concomitant use of FK778 with TAC would result in a beneficial effect in the prevention of allograft rejection. Qi et al. (27) have shown that combined use of MNAs and TAC additively prevents cardiac acute allograft rejection in rats. Also, Schorlemmer et al. (28,29) have reported that this drug combination synergistically induces tolerance in rat skin allografts and prolongs allograft survival in rodents. In this study, we showed that concomitant use of FK778 and TAC synergistically prolonged renal allo-

TABLE 3. Combination therapy of FK778 with tacrolimus in prevention of acute renal allograft rejection in the rat

Treatment ^a	Survival ^b (day)	MST \pm SD	CI ^d	P ^e
1. Naïve controls	7, 7, 7, 7, 8, 8	7.3 ± 0.5	—	—
2. FK778 (10 mg/kg/day)	13, 15, 15, 17, 20, 21	16.8 ± 3.1^c	—	—
3. Tacrolimus (1.0 mg/kg/day)	9, 9, 10, 11, 12, 12	10.5 ± 1.4^c	—	—
4. Conventional combined group ^f	18, 21, 23, 28, 29, 34	25.5 ± 5.9^c	0.458	—
5. FK778-delayed combined group ^g	60 ⁱ , 66 ⁱ , 67, 68, 68, 74, 98 ⁱ , 98 ⁱ	74.9 ± 14.8^c	<0.001	<0.001
6. FK778-pretreated combined group ^h	10, 12, 17, 18, 21, 40, 63, 90, 93, 98	45.1 ± 34.7^c	0.004	0.197

^a Immunosuppressants were administered orally.

^b Rejection was defined as the day before recipient's death or day of sacrifice and was confirmed by macroscopic histology.

^c Significantly prolonged when compared with naïve controls ($P < 0.001$, Student *t* test).

^d CI values were calculated according to median-effect principle.

^e Significantly prolonged when compared with conventional combined group.

^f FK778 10 mg/kg/day (days 1 to 14) + tacrolimus 1.0 mg/kg/day (days 1 to 14).

^g FK778 10 mg/kg/day (days 8 to 14) + tacrolimus 1.0 mg/kg/day (days 1 to 14).

^h FK778 10 mg/kg/day (days -7 to -1) + tacrolimus 1.0 mg/kg/day (days 1 to 14).

ⁱ No apparent sign of renal acute rejection (blood urea nitrogen and serum creatinine levels, histopathologic examination) was seen at time of death (data not shown).

graft survival in rats. Furthermore, when FK778 was not administered concurrently with TAC during the first week after transplantation, renal allograft survival was further extended and a strong synergistic interaction was reached ($CI < 0.001$). A possible explanation for this significant prolongation of recipient survival time seen in the FK778-delayed combined group is that the efficacy of this drug combination could be dependent on the alloimmune response chronology. After their recognition with specific alloantigens of the graft, recipient T cells become activated and they proliferate and differentiate into effector cells. This process usually takes 3 to 4 days to occur after the encounter of T cells with antigen-presenting cells displaying peptide-bound MHC molecules on their surface. Afterward, effector T cells will recruit and activate further lymphoid cells (including B cells) to the site of inflammation to reject the graft. Therefore, T cells play a central role in the alloimmune response, especially during the first week after transplantation. By avoiding the concomitant use of FK778 and TAC, but instead administering TAC alone during the first week after transplantation, we would prevent the possible antagonistic antiproliferative effects on T cells and increase the synergistic immunoinhibitory effects on B cells. In the primary response, as in allogeneic transplantation, B cells start proliferating 5 days after alloantigen recognition and they reach their peak of activation and antibody production after 10 days.

CONCLUSION

This study provides evidence that a combined in vitro use of FK778 and TAC produced synergistic effects in inhibition of B-cell proliferation but has an antagonistic tendency in T cells. Also, the sensitivity of T and B cells to FK778 was species specific: mouse lymphocytes were the most sensitive, Vervet monkey lymphocytes were less sensitive, and human lymphocytes were the least sensitive. Moreover, we showed that combination therapy of FK778 with TAC produced synergistic effects in prolonging rat renal allograft survival and that the level of synergism was drug schedule dependent. This combination therapy is thus suggested in prevention and reversal of acute rejection, but also in chronic and xenograft rejection, because B cells are strongly implicated in the pathogenesis of these immune responses.

Acknowledgments. We thank to Fujisawa Healthcare, Inc. for the supply of FK778 and TAC and for helpful discussions.

REFERENCES

- Williamson RA, Yea CM, Robinson PA, et al. Dihydroorotate dehydrogenase is a high affinity protein binding for A771726 and mediator of a range of biological effects of the immunomodulatory compound. *J Biol Chem* 1995; 270(38): 22467.
- Kuo EA, Hambleton P, Kay DP, et al. Synthesis, structure-activity relationships, and pharmacokinetic properties of dihydroorotate dehydrogenase inhibitors: 2-cyano-3-cyclopropyl-3-hydroxy-N-[3'-methyl-4'(trifluoromethyl)phenyl]propanamide and related compounds. *J Med Chem* 1996; 39: 4608.
- Hausen B, Boeke K, Berry GJ, et al. Potentiation of immunosuppressive efficacy by combining the novel leflunomide analog, HMR279, with microemulsion cyclosporine in a rat lung transplant model. *Transplantation* 1999; 66(3): 354.
- Siemasko KF, Chong ASF, Williams JW, et al. Regulation of B cell function by the immunosuppressive agent leflunomide. *Transplantation* 1996; 61: 635.
- Chong ASF, Rezai K, Gebel HM, et al. Effects of leflunomide and other immunosuppressive agents on T cell proliferation in vitro. *Transplantation* 1996; 61: 140.
- Silva HT, Morris RE. Leflunomide and malononitrilamides. *Am J Med Sci* 1997; 313(5): 289.
- Chong ASF, Huang W, Liu W, et al. In vivo activity of leflunomide: pharmacokinetics analyses and mechanism of immunosuppression. *Transplantation* 1999; 68: 100.
- Cao WW, Kao PN, Chao AC, et al. Mechanism of the antiproliferative action of leflunomide: A77 1726, the active metabolite of leflunomide, does not block T-cell receptor-mediated signal transduction but its antiproliferative effects are antagonized by pyrimidine nucleosides. *J Heart Lung Transplant* 1995; 14(6 pt 1): 1016.
- Davis JP, Cain GA, Pitts WJ, et al. The immunosuppressive metabolite of leflunomide is a potent inhibitor of human dihydroorotate dehydrogenase. *Biochemistry* 1996; 35(4): 1270.
- Greene S, Watanabe K, Braatz-Trulson J, et al. Inhibition of dihydroorotate dehydrogenase by the immunosuppressive agent leflunomide. *Biochem Pharmacol* 1995; 50(6): 861.
- Xu X, Williams JW, Bremer EG, et al. Inhibition of protein tyrosine phosphorylation in T cells by a novel immunosuppressive agent, leflunomide. *J Biol Chem* 1995; 270(21): 12398.
- Elder RT, Xu X, Williams JW, et al. The immunosuppressive metabolite of leflunomide, A771726, affects murine T cells through two biochemical mechanisms. *J Immunol* 1997; 159(1): 22.
- Williams JW, Mital D, Chong A, et al. Experiences with leflunomide in solid organ transplantation. *Transplantation* 2002; 73(3): 358.
- Gerauer K, Maier S, Emmanuilidis K, et al. Long-term cardiac allograft survival in mice treated with malononitrilamide 715. *Transplant Proc* 1998; 30(8): 4205.
- Qi Z, Ekberg H. Malononitrilamides 715 and 279 prolong rat cardiac allograft survival, reverse ongoing rejection, inhibit allospecific antibody production and interact positively with cyclosporin. *Scand J Immunol* 1998; 48(4): 379.
- Kyles AE, Gregory CR, Griffey SM, et al. Leflunomide analog, MNA-715, plus cyclosporine reduces renal allograft rejection in mismatched dogs. *Transplant Proc* 33 (1-2):368, 2001.
- Lin Y, Segers C, Waer M. Efficacy of the malononitrilamide X 920715 as compared with leflunomide in cardiac allo- and xenotransplantation in rats. *Transplant Proc* 1996; 28(6): 3036.
- Vincenti F, Jensik SC, Filo RS, et al. A long-term comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine in kidney transplantation: evidence for improved allograft survival at five years. *Transplantation* 2002; 73(5): 775.
- Margreiter R. European Tacrolimus vs Cyclosporin Microemulsion Renal Transplantation Study Group. Efficacy and safety of tacrolimus compared with cyclosporin microemulsion in renal transplantation: a randomised multicentre study. *Lancet* 2002; 359(9308): 741.
- Boillot O, Baulieux J, Wolf P, et al. Low rejection rates with tacrolimus-based dual and triple regimens following liver transplantation. *Clin Transplant* 2001; 15(3): 159.
- Vu MD, Qi S, Xu D, et al. Synergistic effects of mycophenolate mofetil and sirolimus in prevention of acute heart, pancreas, and kidney allograft rejection and in reversal of ongoing heart allograft rejection in the rat. *Transplantation* 1998; 66(12): 1575.
- Chou TC. The median-effect principle and combination index for quantification of synergism and antagonism. In: Chou TC, Rideout D, eds. *Synergism and antagonism in chemotherapy*. San Diego, Academic Press 1991, p 61.
- Gregory CR, Silva HT, Patz JD, et al. Comparative effects of malononitrilamide analogs of leflunomide on whole blood lymphocyte stimulation in humans, rhesus macaques, cats, dogs, and rats. *Transplant Proc* 1998; 30(4): 1047.
- Mahajan S, Ghosh S, Sudbeck EA, et al. Rational design and synthesis of a novel anti-leukemic agent targeting Bruton's tyrosine kinase (BTK), LFM-A13 [α -cyano- β -methyl-N-(2,5-dibromophenyl) propanamide]. *J Biol Chem* 1999; 274(14): 9587.
- Khan WN. Regulation of B lymphocyte development and activation by Bruton's tyrosine kinase. *Immunol Res* 23(2-3):147, 2001.
- Knecht W, Löffler M. Species-related inhibition of human and rat dihydroorotate dehydrogenase by immunosuppressive isoxazol and cinchoninic acid derivatives. *Biochem Pharmacol* 1998; 56: 1259.
- Qi Z, Simanaitis M, Ekberg H. Malononitrilamides and tacrolimus additively prevent acute rejection in rat cardiac allografts. *Transpl Immunol* 1999; 7(3): 169.
- Schorlemmer HU, Bartlett RR, Lindner JK, et al. Coadministration of malononitrilamides and tacrolimus induces tolerance in a rat skin allograft. *Transplant Proc* 1999; 31(1-2):1148.
- Schorlemmer HU, Bartlett RR, Lindner JK, et al. Long-term allograft survival and tolerance induction by the synergistic activity of malononitrilamides and tacrolimus. *Transplant Proc* 1998; 30(8): 4099.

TROISIÈME CHAPITRE

MANUSCRIT III:

EVALUATION OF THE MALONONITRILAMIDE FK778 COMBINED WITH
TACROLIMUS ON CELL PROLIFERATION ASSAYS, AND IN A MODEL OF
KIDNEY TRANSPLANTATION IN RATS AND NON-HUMAN PRIMATES

Minh Diem Vu, Shijie Qi, Xiang Wang, Wenlei Jiang, Anlun Ma, Dasheng Xu, Pierre
Daloze, Ihor Bekersky, William E. Fitzsimmons, Huifang Chen

Transplantation Proceedings 2003 (sous presse)

Subject Index: Malononitrilamide FK778; Tacrolimus; Allograft; Proliferation; Rats;
Primates

**EVALUATION OF THE MALONONITRILAMIDE FK778 COMBINED WITH
TACROLIMUS ON CELL PROLIFERATION ASSAYS, AND IN A MODEL OF
KIDNEY TRANSPLANTATION IN RATS AND NON-HUMAN PRIMATES**

M.D. Vu, S. Qi, X. Wang, W. Jiang, A. Ma, D. Xu, P. Daloze, I. Bekersky, W.E.
Fitzsimmons, H. Chen

Laboratory of Experimental Surgery, Research Center of *Centre Hospitalier de l'Université
de Montréal* (CHUM), Notre-Dame Hospital, Montreal, Quebec, Canada;
and Fujisawa Healthcare Inc., Deerfield, Illinois, USA

Presented at the 2^{ème} *Congrès de la Société Francophone de Transplantation*, October 24 –
27, 2002, Montreal, Quebec, Canada.

Supported by Fujisawa Healthcare, Inc.; M.D. Vu is a scholarship recipient of the
Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche.

Address for correspondence: Huifang Chen, M.D., Ph.D., Laboratory of
Experimental Surgery, *Centre Hospitalier de l'Université de Montréal* (CHUM; Notre-Dame
Hospital), 2099, Alexandre-de-Seve, Room Y1611, Montreal, Quebec, H2L 2W5, Canada.
Tel.: 514.890.8000 ext. 27081; Fax: 514.412.7581; Email: [REDACTED]

Malononitrilamide (MNA) FK778, also known as MNA 715 or HMR 1715, is a new analogue of leflunomide (LEF)'s active metabolite, A77 1726. LEF and A77 1726 have been demonstrated to possess potent antiproliferative and antiinflammatory properties, to inhibit T and B cells proliferation and their function, and they have been extensively studied in animal models of autoimmune diseases and solid organ transplantation¹. Despite the promising profile of LEF, it has a long half-life (15-18 days) and requires frequent dose adjustment in transplanted patients. The MNAs have been under intense investigation for an indication as anti-rejection drugs. Studies in rodents and dogs reported a potential role of MNAs in prevention of allograft rejection²⁻⁴. The aim of this study was to evaluate the effect of the combination therapy of FK778 with TAC in cell proliferation assays in mice, non-human primates and humans, and in prevention of acute renal allograft rejection in rats and non-human primates.

MATERIALS AND METHODS

Proliferation assay was used to evaluate the effect of FK778 plus TAC on murine splenocytes, monkey lymphocytes and human peripheral blood mononuclear cells, after activation with T- (Con A or PHA) or B-cell (LPS or SAC plus IL-2)-specific mitogens. Cells were cultured in complete RPMI 1640 (37°C, 5% CO₂) with FK778 (1.23-100 µM) and/or TAC (0.09375-6 nM) for 48-72 hours then pulsed for 16-20 hours with 1 µCi/well of ³H-thymidine, before β-scintillation counting. As previously described^{5,6}, kidney transplantation model was performed to evaluate the effect of FK778 combined with TAC to prolong allograft survival in rats (ACI to LEW) and non-human primates (Vervet monkeys from different breeding colonies). The median-effect principle and the combination index (CI) were used to determine synergism (CI<1), summation (CI=1) or antagonism (CI>1). For statistical analysis, recipient survivals were presented as mean survival time and standard deviation (MST ± SD) with comparison among groups performed by Gehan's survival test.

RESULTS

A total of 58 combinations of FK778 plus TAC were evaluated. Of the combinations tested, 82.8% (24/29) produced additive to synergistic effects in B cells, while 79.3% (23/29) showed a tendency of moderate antagonistic effects in T cells, in mice, non-human primates and humans. We further evaluated if the combination therapy of FK778 with TAC would prolong allograft recipient survival. In rats, five groups ($n=6$) were evaluated (Table 1). FK778 and TAC were administered orally for 14 days. In LEW recipients concomitantly treated with a low dose of FK778 (10 mg/kg/day, from day 1 to day 14) and a low dose of TAC (1 mg/kg/day, from day 1 to day 14), a synergistic interaction was seen when compared with monotherapy of FK778 or TAC ($MST=25.5 \pm 5.9$ days, $CI=0.458$). Interestingly, when FK778 treatment was not given at the same time as TAC during the first week following transplantation but was delayed to day 7 posttransplantation, recipient survival became significantly prolonged when compared with conventional combined group ($P<0.001$): In the FK778-delayed combined group, the use of FK778 10 mg/kg/day (from day 8 to day 14) + TAC 1 mg/kg/day (from day 1 to day 14) extended rats survival to 74.9 ± 14.8 days and produced a very strong synergistic interaction ($CI<0.001$). In non-human primates, 11 groups ($n\geq 4$) were evaluated (Table 2). FK778 and TAC were administered orally for 60 days. Same observations were seen in non-human primates. When TAC was initiated immediately after transplantation and FK778 therapy delayed until day 7 after surgery, recipient survivals were significantly prolonged compared with combination therapy of these two agents at the same doses immediately after transplantation: Gr.5 (40.1 ± 16.1) vs Gr.4 (18.8 ± 10.6), $P=0.028$; Gr.8 (47.8 ± 22.5) vs Gr.7 (15.5 ± 18.6), $P=0.038$; Gr.11 (22.2 ± 8.2) vs Gr.10 (8.7 ± 3.3), $P=0.005$.

DISCUSSION

The mechanism of action of LEF and MNAs is quite complex and not fully understood. However, it has been reported that inhibition of de novo pyrimidine biosynthesis by the blockade of the pivotal enzyme dihydroorotate dehydrogenase (DHODH), and the

inhibition of tyrosine kinase activities are the major actions¹. In this study, we showed that FK778 combined with TAC produced synergistic antiproliferative effects in B cells but has an antagonistic tendency in T cells proliferation. This leads us to believe that another molecular pathway, that is sensitive to FK778 and/or TAC, could be implicated in B cells activation and proliferation, but not or to a lesser extent in T cells. Recently, LEF has been reported to inhibit Bruton's tyrosine kinase, an enzyme that plays a pivotal role in B lymphocytes proliferation, but has less implication in T cells⁷. Furthermore, we showed that a concomitant use of FK778 and TAC significantly prolonged recipient survival, but when FK778 was not administered concurrently with TAC during the first week after transplantation, recipient survival was further extended and a very strong synergistic interaction was reached ($CI < 0.001$). A possible explanation of this significant prolongation is that the efficacy of this drug combination could be dependant on the alloimmune response chronology. After their recognition with specific alloantigens of the graft, recipient T cells become activated, and they proliferate and differentiate into effector cells. This process usually takes three to four days to occur after the encounter of T cells with antigen presenting cells displaying peptides bound MHC molecules on their surface. Afterwards, effector T cells will recruit and activate further lymphoid cells (including B cells) to the site of inflammation in order to reject the graft. Therefore, T cells play a central role in the alloimmune response, especially during the first week posttransplantation. By avoiding the concomitant use of FK778 and TAC, but instead employing TAC alone during the first week after transplantation, we would prevent possible antagonistic antiproliferative effects on T cells, and benefit of the synergistic immunoinhibitory effects on B cells. In the primary response, as in allogenic transplantation, B cells start proliferating 5 days after alloantigen recognition and they reach their peak of activation and antibody production after 10 days. This study provides evidence that a combined in vitro use of FK778 and TAC produced synergistic effects in inhibition of B cells proliferation, but has an antagonistic tendency in T cells. Moreover, FK778 combined with TAC produced

synergistic effects in prolonging renal allograft survival in rats and non-human primates, and the level of synergism was drug schedule-dependant.

REFERENCES

1. Silva HT, Morris RE: Am J Med Sci 313 (5): 289, 1997.
2. Gerauer K, Maier S, Emmanuilidis K, et al: Transplant Proc 30 (8): 4205, 1998.
3. Qi Z, Ekberg H: Scand J Immunol 48 (4): 379, 1998.
4. Kyles AE, Gregory CR, Griffey SM et al: Transplant Proc 33 (1-2): 368, 2001.
5. Vu MD, Qi S, Xu D, et al: Transplantation 66 (12): 1575, 1998.
6. Qi S, Xu D, Peng J, et al: Transplantation 69 (7): 1, 2000.
7. Mahajan S, Ghosh S, Sudbeck EA, et al: J Biol Chem 274 (14): 9587, 1999.

TABLE 1. Combination therapy of FK778 with tacrolimus in prevention of acute renal allograft rejection in the rat

Treatment ^a	Survival ^b (day)	MST \pm SD	CI ^d	<i>P</i> ^e
1. Naïve controls	7, 7, 7, 7, 8, 8	7.3 \pm 0.5	-	
2. FK778 10 mg/kg/day	13, 15, 15, 17, 20, 21	16.8 \pm 3.1 ^c	-	
3. Tacrolimus 1.0 mg/kg/day	9, 9, 10, 11, 12, 12	10.5 \pm 1.4 ^c	-	
4. Conventional combined group ^f	18, 21, 23, 28, 29, 34	25.5 \pm 5.9 ^c	0.458	
5. FK778-delayed combined group ^g	60 ^h , 66 ^h , 67, 68, 68, 74, 98 ^h , 98 ^h	74.9 \pm 14.8 ^c	<0.001	<0.001

^a Immunosuppressant were administered orally.

^b Rejection was defined as the day before recipient's death or day of sacrifice, and confirmed by macroscopic histology.

^c Significantly prolonged when compared with naïve controls ($P < 0.001$, Student *t* test).

^d CI values were calculated according to median-effect principle.

^e Significantly prolonged when compared to conventional combined group.

^f FK778 10 mg/kg/day (day 1 to day 14) + tacrolimus 1.0 mg/kg/day (day 1 to day 14).

^g FK778 10 mg/kg/day (day 8 to day 14) + tacrolimus 1.0 mg/kg/day (day 1 to day 14).

^h No apparent sign of renal acute rejection (BUN and serum creatinine levels, histopathology) was seen at time of sacrifice (data not shown).

TABLE 2. Combination therapy of FK778 with tacrolimus in prevention of acute renal allograft rejection in the non-human primate (Vervet monkey)

Treatment ^a	Survival ^b (day)	MST \pm SD	P ^c
1. Naïve controls	4, 7, 7, 8, 10, 11	7.3 \pm 2.5	-
2. TAC 1 mg/kg/day	13, 13, 13, 16, 18, 20	15.5 \pm 3.0	0.001
3. FK778 2.5 mg/kg/day	6, 9, 11, 13	9.8 \pm 3.0	0.266
4. TAC 1 mg/kg/day + FK778 2.5 mg/kg/day Conventional combined group ^d	6, 9, 24, 25, 30	18.8 \pm 10.6	0.016
5. TAC 1 mg/kg/day + FK778 2.5 mg/kg/day FK778-delayed combined group ^e	18, 25, 35, 38, 45, >60, >60	40.1 \pm 16.1	0.002
6. FK778 5 mg/kg/day	5, 8, 9, 10, 12	8.8 \pm 2.6	0.544
7. TAC 1 mg/kg/day + FK778 5 mg/kg/day Conventional combined group ^f	6, 6, 7, 8, 13, 53	15.5 \pm 18.6	0.339
8. TAC 1 mg/kg/day + FK778 5 mg/kg/day FK778-delayed combined group ^g	14, 57, >60, >60	47.8 \pm 22.5	0.002
9. FK778 10 mg/kg/day	7, 8, 8, 9, 10	8.2 \pm 1.2	0.772
10. TAC 1 mg/kg/day + FK778 10 mg/kg/day Conventional combined group ^h	6, 7, 7, 8, 9, 15	8.7 \pm 3.3	0.652
11. TAC 1 mg/kg/day + FK778 10 mg/kg/day FK778-delayed combined group ⁱ	13, 14, 26, 31, 32	22.2 \pm 8.2	0.003

^a Immunosuppressant were administered orally.

- ^b Rejection was defined as day before recipient's death/sacrifice and confirmed by macroscopic histology.
- ^c Significantly prolonged when compared with naïve controls ($P < 0.001$, Student *t* test).
- ^d TAC 1 mg/kg/day (day 1 to day 60) + FK778 2.5 mg/kg/day (day 1 to day 60).
- ^e TAC 1 mg/kg/day (day 1 to day 60) + FK778 2.5 mg/kg/day (day 7 to day 60).
- ^f TAC 1 mg/kg/day (day 1 to day 60) + FK778 5 mg/kg/day (day 1 to day 60).
- ^g TAC 1 mg/kg/day (day 1 to day 60) + FK778 5 mg/kg/day (day 7 to day 60).
- ^h TAC 1 mg/kg/day (day 1 to day 60) + FK778 10 mg/kg/day (day 1 to day 60).
- ⁱ TAC 1 mg/kg/day (day 1 to day 60) + FK778 10 mg/kg/day (day 7 to day 60).

QUATRIÈME CHAPITRE

MANUSCRIT IV:

**SYNERGISTIC EFFECT OF THE COMBINED USE OF WAY-160279, AN
ANTAGONIST OF VERY LATE ANTIGEN-4 (VLA-4), WITH SIROLIMUS ON
PREVENTION OF CARDIAC ALLOGRAFT REJECTION IN THE RAT**

Minh Diem Vu, Shijie Qi, Suren N. Sehgal, Huifang Chen, Jeffrey D. Kennedy

Transplantation 2003 (soumis)

**SYNERGISTIC EFFECT OF THE COMBINED USE OF WAY-160279, AN
ANTAGONIST OF VERY LATE ANTIGEN-4 (VLA-4), WITH SIROLIMUS ON
PREVENTION OF CARDIAC ALLOGRAFT REJECTION IN THE RAT¹**

Minh Diem Vu^{2,4}, Shijie Qi², Suren N. Sehgal³, Huifang Chen^{2,5}, Jeffrey D. Kennedy^{3,6}

Laboratory of Experimental Surgery, Research Center of *Centre Hospitalier de l'Université de Montréal* (CHUM), Notre-Dame Hospital, University of Montreal, Quebec, Canada; and Wyeth Neuroscience, Wyeth Discovery Research, Princeton, New Jersey, USA

Keywords: WAY-160279, VLA-4 antagonist, Sirolimus, Allograft

Word count: Abstract (303), Manuscript (2833), References (30), Tables and figures (3)

Mailing address: Jeffrey D. Kennedy, Ph.D.
Wyeth Neuroscience
Wyeth Discovery Research
CN 8000
Princeton, NJ 08543
Tel.: (732) 274-4279; Fax: (732) 274-4755
Email: [REDACTED]

FOOTNOTES

1. This work was supported by Wyeth Research.
2. Laboratory of Experimental Surgery, Research Center of *Centre Hospitalier de l'Université de Montréal* (CHUM), Notre-Dame Hospital, University of Montreal.
3. Wyeth Neuroscience, Wyeth Discovery Research, Princeton, NJ, USA.
4. Minh Diem Vu is an FRSQ-FCAR-Santé scholarship recipient of the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche.
5. Equal authors
6. Address and correspondence to: Jeffrey D. Kennedy, Ph.D., Wyeth Neuroscience, Wyeth Discovery Research, CN 8000 Princeton, NJ 08543 USA
Tel.: (732) 274-4279; Fax: (732) 274-4755, Email: [REDACTED]

ABBREVIATIONS

BN, Brown Norway; CI, combination index; LEW, Lewis; MST, mean survival time; mAb, monoclonal antibody; mTOR, mammalian target of rapamycin; SIR, Sirolimus; VLA-4, very late antigen-4; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1;

ABSTRACT

Background. Allograft rejection is an immune response triggered by the recognition of graft alloantigens by host recipient lymphoid cells. The fundamental component of the rejection process implies lymphocyte activation and infiltration into the graft, which results from a cascade of cell interactions including leukocyte tethering, rolling, triggering, adhesion to endothelium, and transmigration. Adhesion molecules expressed on leukocytes and endothelial cells play important roles in allograft rejection. The $\beta 1$ integrin very late antigen-4 (VLA-4) is a key adhesion molecule involved in lymphocyte-endothelial cell rolling and firm adhesion, and lymphocyte migration through adhesion to extracellular matrix proteins. Blockade of cell-cell and cell-matrix interactions have been used extensively to modulate immune responses and graft rejection. Sirolimus is a potent immunosuppressant that binds to FKBP12 to form a complex that inhibits the activity of cell-cycle regulatory protein mTOR. In this study, we evaluated the combined use of WAY-160279, a VLA-4 antagonist, with sirolimus in a model of vascularized heart allograft in the rat.

Methods. Heterotopic heart transplantation (BN \rightarrow LEW) was performed in the rat. Recipients were treated with WAY-160279 orally twice daily (10-50 mg/kg) in combination with low doses of sirolimus, for 14 days posttransplantation. Drug interaction between WAY-160279 and sirolimus was assessed using median-effect principle and combination index (CI).

Results. Low (suboptimal) doses of WAY-160279 monotherapy modestly prolonged cardiac allograft survival compared to untreated group ($P < 0.05$). Nevertheless, five different combinations of low doses of WAY-160279 and sirolimus synergistically extended cardiac allograft survival for up to 45 days posttransplantation ($P < 0.001$; CI = 0.174-0.970).

Conclusion. We have demonstrated that a concomitant use of WAY-160279 with sirolimus prolongs cardiac allograft survival in the rat. The protection seen with combined treatment suggests VLA-4 antagonists and sirolimus work synergistically

to prolong graft survival. The results of this initial study warrant further evaluation of this drug combination in larger animal models.

INTRODUCTION

Acute rejection is an immune reaction of the recipient against incompatible transplantation antigens of the graft. This immune and inflammatory response is triggered by T lymphocytes in concert with monocytes and macrophages, and it consists of a cascade of events leading to blood leukocyte transmigration into the graft. The cell interaction cascade can be divided into four steps: leukocyte tethering and rolling, triggering, firm adhesion, and transmigration to the site of inflammation (1). Cell surface adhesion molecules such as selectins, integrins, and members of the immunoglobulin superfamily play an important role in T cell adherence to vascular endothelium and extravasation into perivascular tissue during inflammation and in acute rejection by mediating T cell transmigration through the endothelial cell layer and basement membrane. At the site of inflammation, leukocytes become tethered to the luminal surface of the endothelium by selectin-mediated interactions and roll along the endothelium surface as a result of weak interactions between integrins and their ligands. Several chemokines are also produced, and their interaction with G-protein-linked receptors expressed on leukocyte leads to the triggering of intracellular signaling events and activation of integrins. Once integrins are activated, conformational changes occur and result in high-avidity binding with immunoglobulin superfamily endothelial ligands and firm adhesion of leukocytes to the endothelium. Finally, leukocytes that have adhered firmly to the endothelial surface are capable of migrating toward endothelial cell junctions into the interstitium, under a chemotactic gradient that leads to inflammation site. Adhesion molecules expressed on leukocytes and endothelial cells are known to participate in T lymphocyte activation during allograft rejection after allogeneic organ transplantation (1).

The $\beta 1$ integrin very late antigen-4 (VLA-4), also known as $\alpha 4\beta 1$, is a key adhesion molecule involved in lymphocyte-endothelial cell rolling and firm adhesion, and it interacts with its heterophilic counter-ligand, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), which is expressed on endothelial cells. The VLA-4/VCAM-1 cellular

interaction has been reported to contribute to allograft rejection (2, 3). Moreover, it has been shown that the use of monoclonal antibodies (mAb) against VLA-4 during early stages of acute rejection can suppress lymphocyte migration that causes T lymphocyte activation and can prolong allograft survival (2, 4, 5). Furthermore, it has been reported that VLA-4 binds to fibronectin, a prominent extracellular matrix proteins, and that VLA-4/fibronectin interactions specifically mediate lymphoid cell adhesion and migration. The blockade of VLA-4/fibronectin binding has been shown to prevent acute rejection by suppressing intragraft mononuclear cell accumulation, endothelial activation, and cytokine expression (6).

WAY-160279 is a selective small molecule VLA-4 antagonist that inhibits the interaction of VLA-4 with its primary counter-receptors, VCAM-1 and fibronectin. As such, VLA-4 blockade would result in reduced VLA-4-dependent cell trafficking into tissue allograft and decreased potential activation of tissue-resident cells, based on the known co-stimulatory functions of VLA-4 on leukocytes, primarily T lymphocytes, monocytes, macrophages, eosinophils, and mast cells. Thus, WAY-160279 may be effective in preventing early stages of acute rejection in organ transplantation.

Sirolimus (SIR), also known as rapamycin, is a macrolide antibiotic produced by *Streptomyces hygroscopicus* isolated from a Rapa Nui Island soil sample in 1975 (7). SIR, originally described as an antifungal agent, is a potent immunosuppressant structurally related to tacrolimus (8). SIR interacts with the same cytoplasmic binding protein, FKBP12, which tacrolimus binds. However, the mechanism of action of SIR is unique and quite different from calcineurin inhibitors. It has been reported that the complex SIR/FKBP12 interacts with a multifunctional protein, mammalian target of rapamycin (mTOR), and inhibits its phosphatidyl kinase activity that regulates the state of phosphorylation of several receptors and enzymes of the cell cycle. Thus, SIR interferes with many pathways, including the blockade of p70S6 kinase pathway resulting in protein synthesis inhibition, the inhibition of CD28-I κ B κ pathway that results in a decrease of gene transcription of cytokines, and the blockade cdk2/cyclin E interaction with p27 that leads to inhibition of gene transcription of several regulator proteins of

the cell cycle (p34cdc2, cyclin A) (9). As a consequence of the blockade of mTOR, SIR inhibits T lymphocyte proliferation in the middle to late G₁-Sphase of the cell cycle, as well as cytokine production and B lymphocyte proliferation induced by calcium-dependent and -independent signals (9, 10, 11). SIR is also a strong immunosuppressive agent with 10- to 100-fold greater potency than cyclosporine in prevention of vascularized allograft rejection in animal models, and it is also effective in alleviation of ongoing acute rejection of kidney, pancreas, and heart allografts in the rat (12-16). We have previously reported that sirolimus also acts directly on B lymphocyte and effectively inhibits immunoglobulin production in vitro and in vivo (17, 18). Moreover, we have shown that SIR-induced long-term allograft tolerance depends on the persistence of alloantigen (19). An interesting characteristic of SIR is that its short-term administration (one bolus or 7-14 days continuous infusion) can extend vascularized allograft survival to more than 60-200 days, including heart, kidney, pancreas, and small bowel (12, 14, 20).

The strategy of multiple immunosuppressive therapies for organ transplantation, such as the combination of appropriate immunosuppressive agents, is to enhance therapeutic efficacy while minimizing toxicity and side effects of individual drugs used in the regimen. Calcineurin inhibitors (tacrolimus, cyclosporine) are currently the major immunosuppressive treatments in clinical organ transplantation. Nevertheless, their side effects (including nephrotoxicity, neurotoxicity, hypertension, and hyperlipidemia) are indeed the greatest limitation to wider use of these immunosuppressive agents, particularly when prolonged administration may be anticipated, as in treatment of autoimmune diseases. The aim of the present study was to evaluate the effect of a new immunosuppressive agent, WAY-160279, in combination with SIR in the prevention of acute cardiac allograft rejection in the rat.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Adult (9 to 11 weeks old) male Brown Norway (BN, RT1ⁿ), and Lewis (LEW, RT1^l) rats were purchased from Charles River Laboratories (Quebec, Canada) and were assigned as donor and recipient, respectively. The rats were housed in controlled light/dark cycles and allowed free access to water and rat chow.

Immunosuppressants. WAY-160279 and SIR were kindly donated by Wyeth Research (Rouses Point, NY). WAY-160279 was dissolved in a vehicle including polyethylene glycol 400 (45%), propylene glycol (45%), and polysorbate 80 (10%) and administered by gavage twice daily, according to the recipient's weight. SIR was diluted in a vehicle containing polyethylene glycol 400 (70%), N,N-dimethylacetamide (20%), and polysorbate 80 (10%). The drug was delivered intravenously via a 14-day 2002 osmotic pump (Alzet, Palo Alto, CA) filled with SIR. The pumps were primed for 2-3 hr in sterile saline at 37°C and were then inserted into recipient lumbar vein immediately after completion of transplantation procedure.

Cardiac transplantation. Heterotopic heart transplants were placed intra-abdominally by a method described by Ono and Lindsey with some modifications (21). End-to-side anastomoses of the donor aorta to the recipient aorta and the donor pulmonary artery to the recipient vena cava were performed. The function of the transplanted BN heart was evaluated by daily abdominal palpation. The time of rejection was defined as last day of palpable cardiac contraction, and the rejection was confirmed by macroscopic histology after laparotomy. Animal that lost palpable activity within 3 days after surgery were classified as technical failure (less than 3%) and were omitted from data analysis. LEW recipient rats received BN heart and were treated with WAY-160279 orally twice a day and/or SIR intravenously at different doses for a period of 14 days, starting from day of transplantation.

Data analysis of drug interaction. For statistical analysis, cardiac allograft survivals were presented as mean survival time (MST \pm SD) with comparison among performed by Gehan's survival test. The drug interaction between WAY-160279 and SIR was

assessed by the median-principle (22), which is based on the premise that the effect of each drug is related to its dose and therefore be calculated using the following equation,

$$(fa/fu) = (D/Dm)^m$$

where fa and fu respectively represent the fractions of the system that are affected (% inhibition or rather days of survival beyond control group) and unaffected ($1 - fa$) by the drug at dose D . Full protection ($fa = 1$) is defined as at least a 60-day survival of heart allograft. Dm is the dose that causes 50% inhibition (ED_{50}), the median effect; and m is a coefficient that describes the sigmoidicity of the dose-effect curve. The interaction between two agents (synergism, summation, or antagonism) is determined by the combination index (CI),

$$CI_x = \frac{D_1 \text{ combined} + D_2 \text{ combined} + (D_1 \text{ combined})(D_2 \text{ combined})}{D_1 \text{ alone} + D_2 \text{ alone} + (D_1 \text{ alone})(D_2 \text{ alone})}$$

$$\frac{D_1 \text{ combined} + D_2 \text{ combined} + (D_1 \text{ combined})(D_2 \text{ combined})}{D_1 \text{ alone} + D_2 \text{ alone} + (D_1 \text{ alone})(D_2 \text{ alone})}$$

where D_1 combined and D_2 combined correspond to the amount of drug 1 and drug 2, respectively. D_1 and D_2 each display $x\%$ inhibition for the mutually exclusive case where both agents have distinct mechanisms of action. According to Chou's definition, CI values lower than 1.0 (<1) suggest synergism, whereas those equal to 1.0 ($=1$) indicate summation, and those higher than 1.0 (>1) describe antagonism. A computer software program was used to evaluate dose-effect parameters (Dm , m and r) and CI values (Calculusyn, Biosoft).

RESULTS

Synergistic effects of the combination therapy of WAY-160279 with SIR in prevention of acute cardiac allograft rejection. In untreated LEW recipient rats receiving BN cardiac allograft, a mean graft survival time of 6.5 ± 0.5 days was observed. LEW recipients treated with WAY-160279 (30 and 50 mg/kg, *p.o.*, *bid*) had a significantly extended BN heart allograft survival with a respective MST of 11.8 ± 3.0 , and 14.2 ± 2.1 days, when compared with naïve control ($P < 0.001$, Table 1). However, a treatment of 10 mg/kg of WAY-160279 failed to prolong cardiac allograft survival (MST = 6.7 ± 0.5 days). SIR monotherapy significantly prolonged BN cardiac allograft survival of LEW recipient rats to a MST of 15.7 ± 0.8 (0.02 mg/kg, *i.v.*), 22.7 ± 3.4 (0.04 mg/kg, *i.v.*), and 31.5 ± 2.3 days (0.08 mg/kg, *i.v.*), when compared with untreated group ($P < 0.001$). When low (suboptimal) doses of WAY-160279 (30 mg/kg) and SIR (0.02 mg/kg) were combined for 14 days, a slight synergistic interaction between WAY-160279 and SIR was observed with a MST of 20.3 ± 3.6 days ($P < 0.001$; CI = 0.894, Figure 1). Moreover, a synergistic effect was observed in combined use of WAY-160279 (50 mg/kg) and SIR (0.02 mg/kg), which maintained BN cardiac allograft survival for a MST of 24.7 ± 1.9 days ($P < 0.001$; CI = 0.678). Combined use of WAY-160279 (10 mg/kg) and SIR (0.04 mg/kg) produced nearly additive interaction with a MST of 24.0 ± 1.7 days ($P < 0.001$; CI = 0.970, Figure 2) when compared with WAY-160279 or SIR used alone. A strong synergistic interaction was observed with the combined use of WAY-160279 (30 mg/kg) and SIR (0.04 mg/kg), which extended significantly cardiac allograft survival to a MST of 41.3 ± 8.2 days when compared with WAY-160279 or SIR monotherapy ($P < 0.001$; CI = 0.232). Furthermore, WAY-160279 (50 mg/kg) and SIR (0.04 mg/kg) in combination prolonged heart graft survival to a MST of 44.5 ± 12.4 days (CI = 0.174), which represented strong synergistic interaction compared with WAY-160279 or SIR used alone. Except for the group treated with 10 mg/kg of WAY-160279, all treated groups had a significant longer cardiac allograft survival than the naïve control group ($P < 0.001$).

DISCUSSION

In this study, we evaluated whether a concomitant use of WAY-160279 with SIR would result in a beneficial (synergistic or at least additive) effect in extending vascularized heart allograft survival in the rat. Our results clearly demonstrate that a combined use of low doses of WAY-160279 and SIR synergistically prolongs allograft survival when compared with each agent alone. This study also indicates that monotherapy of WAY-160279 or SIR significantly extent graft survival, although WAY-160279 anti-VLA-4 treatment is less effective than sirolimus to prevent acute allograft rejection in this model.

It is well known that VLA-4 plays important roles in the process of graft rejection by being involved in the cascade of events leading to extravasation of leukocytes into allograft and in subsequent migration of leukocytes through extracellular matrix. In the mid 90's, VLA-4 mAb were designed as immunosuppressive treatment to prevent allograft rejection. Previous studies have reported that VLA-4 mAb treatments can prolong cardiac, corneal and small bowel allografts survival in rodents (2,4) and can induce immunological tolerance through second allograft acceptance when combined with anti-leukocyte function-associated antigen-1 mAb (23). In an elegant study, Coito et al. (6) showed that blockade of VLA-4 binding to fibronectin prevents acute rejection by suppressing intragraft deposition of total fibronectin and accumulation of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and activated CD25⁺ mononuclear cells. The authors also demonstrated that endothelial activation was diminished through a decreased intragraft mRNA expression of several adhesion molecules, including VLA-4, VCAM-1 and intercellular adhesion molecule-1. Moreover, expression of mRNA coding for Th1 (interleukin (IL)-2 and interferon- γ) and Th2 (IL-4, IL-5, and IL-6) cytokines was decreased in vascularized cardiac allografts. In contrast, a study conducted by Yang et al. (24) showed that the blockade of VLA-4-dependent leukocyte-endothelial interactions by VLA-4 mAb treatment alone was insufficient to delay acute rejection of pancreatic islet in rat recipients. In addition, it has been suggested that protective effects

afforded by VLA-4 integrin mAb are shorted-lived and insignificant upon alloantigen-driven mononuclear and endothelial cell activation. Thus, it is conceivable that a combined use of low doses of WAY-160279 with another immunosuppressive agent would be more efficacious to prevent acute allograft rejection than WAY-160279 alone.

In this initial study, we have shown that clinically suboptimal doses of WAY-160279 (30 and 50 mg/kg *bid*) or SIR (0.02-0.08 mg/kg) alone can induce significantly prolonged cardiac allograft survival. Somehow, 50 mg/kg of WAY-160279 given orally twice a day during 14 days extended allograft survival to 14 days only compared to 6.5 days in untreated rat recipients. According to these data, we can speculate that higher doses of WAY-160279 may be used to prevent graft rejection when administered in monotherapy. Even though we did not evaluate WAY-160279 or SIR dose-related toxicities, it is reasonable to state that the possibility of causing side effects in recipients are greater with higher doses of WAY-160279 or SIR. At present, no data on VLA-4 antagonist side effects have been reported yet. On the other hand, clinical studies have shown that SIR (2-5 mg/day) can induce hyperlipidemia, hypercholesteremia, thrombocytopenia, and tremor (25,26). The combined use of SIR and cyclosporine has also been reported to further impair recipient glomerular function than that seen with the use of azathioprine plus cyclosporine. Somehow, SIR alone has not been reported to cause nephrotoxicity.

In contrast with cyclosporine and tacrolimus, WAY-160279 and SIR are not calcineurin inhibitors. Therefore, there is no acknowledged evidence that anti-VLA-4 inhibitors or sirolimus alone promote nephrotoxicity as seen with large doses of calcineurin antagonists. The combined use of WAY-160279 with SIR would represent a potent immunosuppressive therapy without causing inhibition of calcineurin-dependent activities. Thus, this drug combination would be beneficial to prevent allograft rejection and particularly when long-term immunosuppression is required as in the treatment of autoimmune disorders.

In addition to effects on acute rejection, the combined use of WAY-160279 with SIR could be effective to prevent and treat chronic allograft rejection. A VLA-4 mAb

treatment has been shown to inhibit graft vasculitis and interstitial cellular infiltration in rat cardiac allograft (27). In addition, a recent study conducted by Zohlnhöfer et al. (28) reported that adhesion of monocyte VLA-4 to endothelial VCAM-1 induces IL-1 β -dependent expression of IL-6 in endothelial cells and therefore could contribute to local systemic inflammatory reactions as seen in atherosclerosis and chronic graft rejection. The VLA-4 antagonist WAY-160279, by blocking VLA-4/VCAM-1 interactions, could be used as a prophylaxis of chronic rejection and atherosclerosis. The effects of WAY-160279 on IL-1 and IL-6 production or gene expression in models of graft rejection are currently being investigated. Recently, Morris' group reported that SIR halts and reverses progression of allograft vascular disease in non-human primates by decreasing intimal thickening and fibrosis of the vessel wall in a model of aortic transplantation (29). Moreover, a recent clinical study led by Sousa et al. (30) showed that implantation of sirolimus-coated stents in human coronary arteries prevents neointimal proliferation, thus reducing restenosis after angioplasty. Chronic rejection is one of the major limitations to long-term success in solid organ transplantation. Indeed, conventional immunosuppressive therapies fail to prevent or treat chronic rejection. The combined treatment of WAY-160279 plus SIR may be a unique immunosuppressive therapy that could be effective in prevention and treatment of both acute and chronic allograft rejection. Further investigations in rodents and primates are indeed required to verify the efficacy of a combined use of WAY-160279 and SIR to prevent and treat graft vascular disease, commonly known as chronic rejection.

In conclusion, our present study demonstrated that a concomitant therapy of suboptimal doses of WAY-160279 and SIR produces synergistic effects in prevention of cardiac allograft rejection in the rat. The results from this initial study warrant further investigation into the potential of combining VLA-4 antagonists with standard immunosuppressive therapy in primate allograft models as a prelude to possible human clinical trials and potentially in a phase I human trial.

ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to Wyeth Research for providing the supply of WAY-160279 and SIR, and for helpful discussions.

REFERENCES

1. Fuggle SV, Koo DDH. Cell adhesion molecules in clinical renal transplantation. *Transplantation* 1998; 65 (6): 763.
2. Isobe M, Suzuki JI, Yagita H, Okumura KO, Yamazaki S, Nagai R, Yazaki Y, Sekiguchi M. Immunosuppression to cardiac allografts and soluble antigens by anti-vascular cellular adhesion molecule-1 and anti-very late antigen-4 monoclonal antibodies. *J Immunol* 1994; 153: 5810.
3. Korczak-Kowalska G, Durlik M, Wierzbicki P, Wyzgal J, Lis-Lachowicz K, Morzycka-Michalik M, Mrowiec T, Nowaczyk M., Gorski A. Lymphocyte adhesion molecules in renal allograft rejection. *Transplant Proc* 1996; 28 (6): 3437.
4. Hori J, Yamagami S, Obata H, Tsuru T, Isobe M. Effect of monoclonal antibody to VLA-4 on corneal allograft survival in mice. *Transplant Proc* 1996; 28 (3): 1990.
5. Tice DG, Bruch D, Ikramuddin S. Anti-VLA-4 and cyclosporine synergistically prolong rat heterotopic small bowel allograft. *Transplant Proc* 1996; 28 (5): 2496.
6. Coito AJ, Korom S, Graser E, Volk HD, Van De Water L, Kupiec-Weglinski JW. *Transplantation* 1998; 65 (5): 699.
7. Vezina C, Kudelski A, Sehgal S. Rapamycin (AY-22.989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of active principle. *J Antibiot* 1975; 28: 721.
8. Sehgal SN, Baker H, Vezina C. Rapamycin (AY-22.989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)* 1975; 28: 727.
9. Rapamune® (RAPA, rapamycin, sirolimus): Mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin Biochem* 1998; 31 (5): 335.
10. Sehgal SN. Rapamune (sirolimus, rapamycin): an overview and mechanism of action. *Ther Drug Monit* 1995; 17: 660.
11. Molnar-Kimber KL. Mechanism of action of rapamycin (sirolimus, rapamycin). *Transplant Proc* 1996; 28: 964.

12. Calne RY, Collier DstJ, Lim S. Rapamycin for immunosuppression in organ allografting. *Lancet* 1989; 2: 227.
13. Morris RE, Meiser M. Identification of a new pharmacologic action for an old compound. *Med Sci Res* 1989; 17: 609.
14. Stepkowski SH, Chen H, Daloze P, Kahan B. Rapamycin, a potent immunosuppressive drug for vascularized heart, kidney, and small bowel allografts. *Transplantation* 1991; 52: 22.
15. Chen H, Wu J, Luo HY, Daloze P. The immunosuppressive effect of rapamycin on pancreaticoduodenal transplantation in the rat. *Transplant Proc* 1991; 23: 2239.
16. Chen H, Wu J, Xu D, Luo HY, Daloze P. Reversal of ongoing heart, kidney, and pancreas allograft rejection and suppression of accelerated heart allograft rejection in the rat by rapamycin. *Transplantation* 1993; 56: 661.
17. Luo HY, Chen H, Daloze P, Chang J, Wu J. Inhibition of in vitro immunoglobulin production by rapamycin. *Transplantation* 1992; 53: 1071.
18. Chen H, Luo HY, Daloze P, Wu J. Long-term in vivo effects of rapamycin on humoral and cellular immune responses in the rat. *Immunobiology* 1993; 188: 303.
19. Chen H, Luo H, Daloze P, Xu D, Wu J. Rapamycin-induced long-term allograft survival depends on persistence of alloantigen. *J Immunol* 1994; 152: 3107.
20. Chen H, Qi S, Xu D, Wu J, Daloze P. The immunosuppressive effect of rapamycin on orthotopic small bowel transplantation. *Transplantation* 1996; 61: 523.
21. Vu MD, Qi S, Xu D, Wu J, Fitzsimmons WE, Sehgal SN, Dumont L, Busque S, Daloze P, Chen H. Tacrolimus (FK506) and sirolimus (rapamycin) in combination are not antagonistic but produce extended graft survival in cardiac transplantation in the rat. *Transplantation* 1997; 64 (12): 1853.
22. Chou TC. The median-effect principle and combination index for quantitation of synergism and antagonism. In: Chou TC, Rideout D, Eds. *Synergism and antagonism in chemotherapy*. San Diego: Academic Press, 1991: 61.

23. Hori J, Isobe M, Yamagami S, Tsuru T. Acceptance of second corneal allograft by combination of anti-VLA-4 and anti-LFA-1 monoclonal antibodies in mice. *Transplant Proc* 1998; 30: 200.
24. Yang H, Issekutz TB, Wright JR. Prolongation of rat islet allograft survival by treatment with monoclonal antibodies against VLA-4 and LFA-1. *Transplantation* 1995; 60 (1): 71.
25. Kahan BD. Efficacy of sirolimus compared with azathioprine for reduction of acute renal allograft rejection: a randomised multicentre study. The Rapamune US Study Group. *Lancet* 2000; 356 (9225): 194.
26. MacDonald AS. A worldwide, phase III, randomized, controlled, safety and efficacy study of a sirolimus/cyclosporine regimen for prevention of acute rejection in recipients of primary mismatched renal allografts. *Transplantation* 2001; 71(2): 271.
27. Paul LC, Davidoff A, Paul DW, Benediktsson H, Issekutz TB. Monoclonal antibodies against LFA-1 and VLA-4 inhibit graft vasculitis in rat cardiac allografts. *Transplant Proc* 1993; 25 (1): 813.
28. Zöhlhörer D, Brand K, Schipek K, Pogatsa-Murray G, Schömig A, Neumann FJ. Adhesion of monocyte very late antigen-4 to endothelial vascular cell adhesion molecule-1 induces interleukin-1 β -dependent expression of interleukin-6 in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 200; 20: 353.
29. Ikoken TS, Gummert JF, Hayase M, Honda Y, Hausen B, Christians U, Berry G, Yock PG, Morris RE. Sirolimus (rapamycin) halts and reverses progression of allograft vascular disease in non-human primates. *Transplantation* 2000; 70 (6): 969.
30. Sousa JE, Costa MA, Abizaid A, Abizaid AS, Feres F, Pinto IMF, Seixas AC, Staico R, Mattos LA, Sousa AGMR, Falotico R, Jaeger J, Popma JJ, Serruys PW. Lack of neointimal proliferation after implantation of sirolimus-coated stents in human coronary arteries. A quantitative coronary angiography and three-dimensionnal intravascular ultrasound study. *Circulation* 2001; 103: 192.

FIGURE LEGEND

FIGURE 1. Combination therapy of WAY-160279 with sirolimus (0.02 mg/kg/day) in prevention of cardiac allograft acute rejection in the rat. A concomitant 14-day use of WAY-160279 (30 or 50 mg/kg *bid*) plus SIR (0.02 mg/kg/day) showed synergistic effects in prolongation of allograft survival (MST=20.3 ± 3.6 days, CI = 0.894; MST = 24.7 ± 31.9 days, CI = 0.678).

FIGURE 2. Combination therapy of WAY-160279 with sirolimus (0.04 mg/kg/day) in prevention of cardiac allograft acute rejection in the rat. A concomitant 14-day use of WAY-160279 (10, 30 or 50 mg/kg *bid*) plus SIR (0.04 mg/kg/day) showed synergistic effects in prolongation of allograft survival (MST=24.0 ± 1.7 days, CI = 0.970; MST = 41.3 ± 8.2 days, CI = 0.232; MST = 44.5 ± 12.4 days, CI = 0.174).

Table 1. Lewis recipient rats receiving Brown Norway cardiac allograft treated the combination therapy of WAY-160279 and sirolimus

Treatment ^a	Survival (days)	MST \pm SD ^b	CI ^c
1. None	6, 6, 6, 7, 7, 7	6.5 \pm 0.5	-
2. WAY-160279 10 mg/kg	6, 6, 7, 7, 7, 7	6.7 \pm 0.5	-
3. WAY-160279 30 mg/kg	8, 8, 8, 9, 12, 12, 13, 13, 13, 14, 15, 17	11.8 \pm 3.0 ^d	-
4. WAY-160279 50 mg/kg	12, 13, 13, 14, 15, 18	14.2 \pm 2.1 ^d	-
5. SIR 0.02 mg/kg/day	15, 15, 15, 16, 16, 17	15.7 \pm 0.8 ^d	-
6. SIR 0.04 mg/kg/day	16, 22, 24, 24, 25, 25	22.7 \pm 3.4 ^d	-
7. SIR 0.08 mg/kg/day	28, 30, 32, 32, 32, 35	31.5 \pm 2.3 ^d	-
8. WAY-160279 30 mg/kg + SIR 0.02 mg/kg/day	17, 17, 18, 21, 24, 25	20.3 \pm 3.6 ^d	0.894
9. WAY-160279 50 mg/kg + SIR 0.02 mg/kg/day	23, 23, 24, 25, 25, 28	24.7 \pm 1.9 ^d	0.678
10. WAY-160279 10 mg/kg + SIR 0.04 mg/kg/day	22, 23, 23, 24, 26, 26	24.0 \pm 1.7 ^d	0.970
11. WAY-160279 30 mg/kg + SIR 0.04 mg/kg/day	32, 37, 37, 41, 46, 55	41.3 \pm 8.2 ^d	0.232
12. WAY-160279 50 mg/kg + SIR 0.04 mg/kg/day	31, 38, 38, 40, >60, >60	44.5 \pm 12.4 ^d	0.174

^a WAY-160279 was administered by gavage twice a day for 14 days. Sirolimus was infused by a 14-day 2002 osmotic pump connected to the lumbar vein of the recipient.

^b Rejection was defined as the last day of palpable heart contraction and confirmed by macroscopic histology after laparotomy.

^c CI values for WAY-160279 and sirolimus interaction calculated as shown in statistical analysis.

^d Significantly prolonged compared with no treatment ($P < 0.05$).

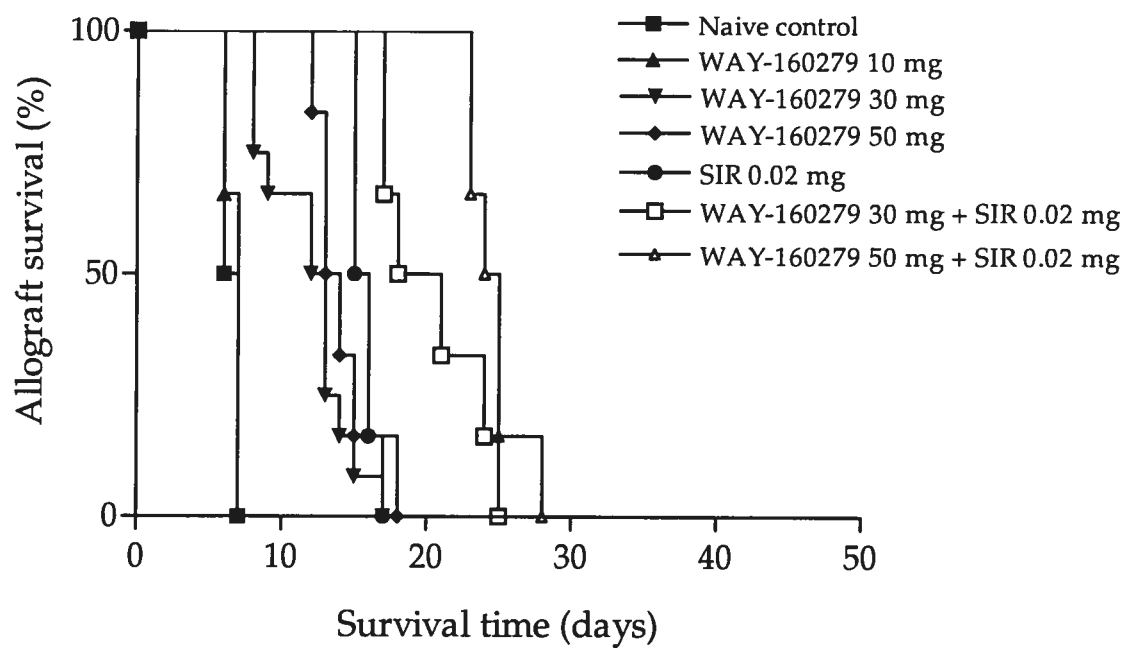


FIGURE 1

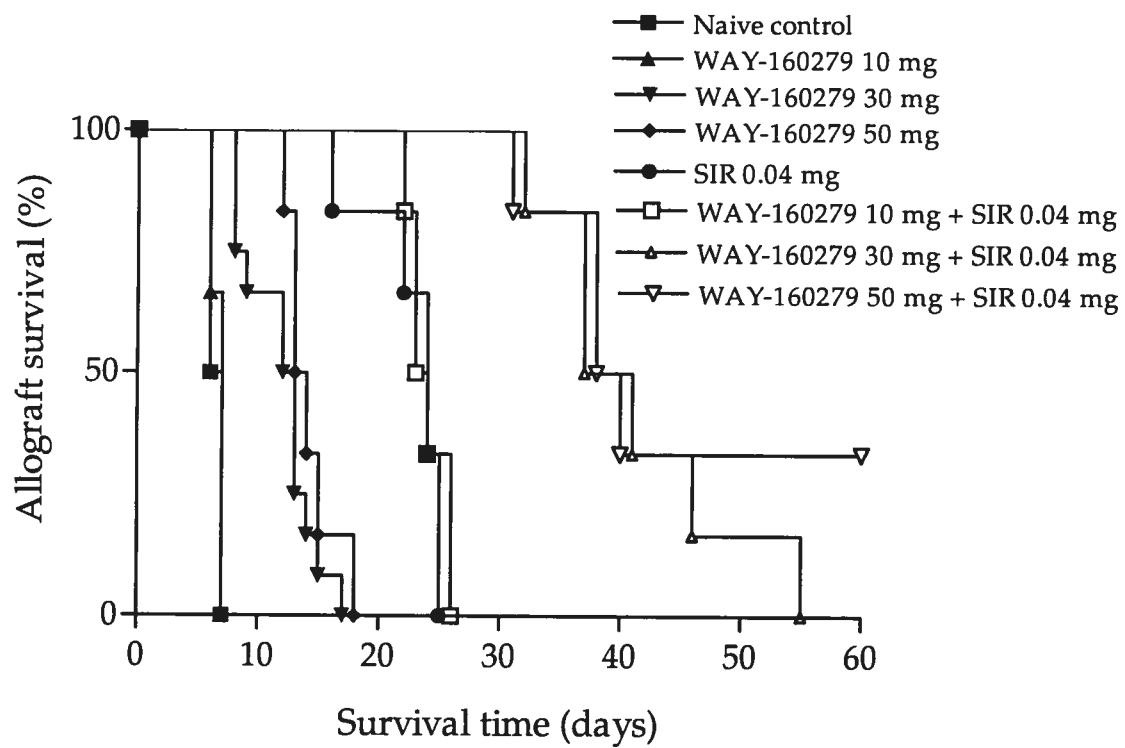


FIGURE 2

CINQUIÈME CHAPITRE

MANUSCRIT V:

**SIGNIFICANT PROLONGATION OF RENAL ALLOGRAFT SURVIVAL WITH
THE COMBINATION THERAPY OF P-SELECTIN GLYCOPROTEIN LIGAND-1
(rPSGL-Ig) AND CYCLOSPORINE BUT NOT SIROLIMUS, TACROLIMUS, OR
MYCOPHENOLATE MOFETIL IN THE RAT**

**Minh Diem Vu, Shijie Qi, Jun Ouyang, Wenlei Jiang, Dasheng Xu, Gray D. Shaw,
Huifang Chen**

Transplantation 2003 (soumis)

**SIGNIFICANT PROLONGATION OF RENAL ALLOGRAFT SURVIVAL WITH
THE COMBINATION THERAPY OF P-SELECTIN GLYCOPROTEIN LIGAND-1
(rPSGL-Ig) AND CYCLOSPORINE BUT NOT SIROLIMUS, TACROLIMUS, OR
MYCOPHENOLATE MOFETIL IN THE RAT¹**

Minh Diem Vu^{2,4}, Shijie Qi², Jun Ouyang², Wenlei Jiang², Dasheng Xu², Gray D. Shaw³,
Huifang Chen^{2,5}

Laboratory of Experimental Surgery, Research Center of *Centre Hospitalier de l'Université
de Montréal* (CHUM), Notre-Dame Hospital, University of Montreal, Quebec, Canada;
and Wyeth Research, Cambridge, Massachusetts, USA.

Keywords: rPSGL-Ig, sirolimus, tacrolimus, cyclosporine, mycophenolate mofetil, rat
renal allograft

Word count: Abstract (250), Manuscript (3386), References (35), Tables and Figures (3)

Mailing address:

Huifang Chen, M.D. Ph.D.
Laboratory of Experimental Surgery,
Research Center of *Centre Hospitalier de
l'Université de Montréal* (CHUM; Notre-
Dame Hospital), 2099 Alexandre-de-
Seve, Room Y1611, Montreal, Quebec,
H2L 2W5, Canada

FOOTNOTES

1. This work was supported by Wyeth Research.
2. Laboratory of Experimental Surgery, Research Center of *Centre Hospitalier de l'Université de Montréal* (CHUM), Notre-Dame Hospital, University of Montreal.
3. Wyeth Research, Cambridge, Massachusetts, USA.
4. Minh Diem Vu is a FRSQ-FCAR-Santé scholarship recipient of the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche.
5. Address for correspondence: Huifang Chen, M.D., Ph.D., Laboratory of Experimental Surgery, *Centre Hospitalier de l'Université de Montréal* (CHUM; Notre-Dame Hospital), 2099, Alexandre-de-Seve, Room Y1611, Montreal, Quebec, H2L 2W5, Canada; Email: [REDACTED]

ABBREVIATIONS

CsA; Cyclosporine; I/R; ischemia/reperfusion; LEW, Lewis; MMF, mycophenolate mofetil; MST, mean survival time; PSGL-1, P-selectin glycoprotein ligand-1; SIR, Sirolimus; TAC, Tacrolimus; rPSGL-Ig, Recombinant, soluble, Ig-fusion form of P-selectin glycoprotein ligand-1.

ABSTRACT

Background. rPSGL-Ig is a recombinant, soluble, Ig-fusion form of P-selectin glycoprotein ligand-1 used as an antagonist to P- and E-selectin, the key adhesion molecules that mediate leukocyte rolling on activated endothelium and platelets at sites of inflammation. Acute treatment with rPSGL-Ig has been shown to prevent ischemia/reperfusion injury and reduce host inflammatory responses after transplantation. In this study, we evaluated the combination therapy of rPSGL-Ig with conventional immunosuppressants in prevention of acute renal allograft rejection in the rat.

Methods. Twelve groups (n=5) of Lewis rats were orthotopically transplanted with rPSGL-Ig (100 µg) pretreated allograft kidney from ACI rats, and then treated for recipient intravenously with rPSGL-Ig (100 µg at reperfusion) in combination with oral doses of sirolimus (SIR) 0.8 mg/kg/day, tacrolimus (TAC) 1 mg/kg/day, cyclosporine (CsA) 4 mg/kg/day, or mycophenolate mofetil (MMF) 10 mg/kg/day, for 3 days, after allografting.

Results. The naïve control group showed a mean survival time of 7.5 ± 0.9 days. A treatment of rPSGL-Ig alone failed to prolong renal allograft survival (6.5 ± 0.8 days, $P=0.065$). A 3-day monotherapy of SIR, TAC, CsA or MMF modestly extent recipient survival compared with naïve controls (9.8 ± 2.1 days, $P=0.032$; 12.3 ± 5.0 days, $P=0.043$; 9.5 ± 2.1 days, $P=0.053$; 8.2 ± 0.2 days, $P=0.200$, respectively). When rPSGL-Ig treatment was combined with CsA, recipient survival was significantly prolonged compared with CsA-treated alone (50.8 ± 37.2 days, $P=0.045$).

Conclusion. rPSGL-Ig combined with CsA prevents renal allograft rejection in rats, but not when concomitantly used with SIR, TAC, or MMF.

INTRODUCTION

Ischemia/reperfusion (I/R) injury is inevitable in organ transplantation and has important implications in the pathogenesis of graft rejection. Inflammation is one of major mechanisms leading to organ damage in the course of renal I/R (1). Acute allograft rejection is an immune reaction initiated by the recognition of incompatible alloantigens of the graft by the recipient's immune cells, including T lymphocytes, monocytes and macrophages. This inflammatory response consists of a cell interaction cascade of four step events leading to blood leukocyte transmigration into the graft: leukocyte tethering and rolling, triggering, firm adhesion, and transmigration to the site of inflammation (2). Cell surface adhesion molecules such as selectins, integrins, and members of the immunoglobulin superfamily play an important role in T cell extravasation into perivascular tissue during inflammation and acute rejection by mediating T cell transmigration through the endothelial cell layer and basement membrane. At the site of inflammation, leukocytes become tethered to the luminal surface of the endothelium by selectin-mediated interactions and roll along the endothelium surface as a result of weak interactions between integrins and their ligands. Several chemokines are also produced and their interaction with G-protein-linked receptors expressed on leukocyte leads to the triggering of intracellular signaling events and activation of integrins. After integrin activation, conformational changes occur and result in high-avidity binding with immunoglobulin superfamily endothelial ligands and firm adhesion of leukocytes to the endothelium. Finally, under a chemotactic gradient that leads to the inflammation site, firmly adhered leukocytes of the endothelial surface are capable of migrating toward endothelial cell junctions into the interstitium. Adhesion molecules expressed on leukocytes and endothelial cells are known to participate in T lymphocyte activation during graft rejection after allogeneic organ transplantation (3). A growing body of evidence, primarily from animal models of I/R injury and preliminary human studies, has shown that inflammatory mechanisms play an important role in the pathogenesis of I/R injury. During the last

decade, there has been an explosion of research documenting the role of adhesion molecules in I/R injury via the recruitment of leukocytes into sites of tissue injury (4).

The selectin family of leukocytes molecules includes three members: L (leukocyte)-, P (platelet and endothelial)-, and E (endothelial)-selectin, which are involved in the initial adhesion of leukocytes to activated endothelium at the site of inflammation or tissue injury (3). P-selectin (CD62P) is a cell surface glycoprotein that is a key adhesion molecule involved in leukocyte-endothelial cell and leukocyte-activated platelet rolling and transmigration to the injured or inflamed vascular wall. P-selectin is constitutively stored in Weibel-Palade bodies of endothelial cells as well as alpha granules of platelets, and it is rapidly expressed and mobilized to the cell surface after exposure to inducing stimuli such as thrombin and inflammatory cytokines. Following tissue injury, leukocyte rolling on the vascular endothelium is mainly mediated by P-selectin (4, 5). E-selectin (CD62E) is exclusively expressed by cytokine-activated endothelial cells, and it mediates their adhesion to neutrophils. Endothelial cell expression of E-selectin is recognized as a hallmark of acute cytokine-mediated inflammation (3, 4). P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) is the major ligand to P-selectin, but it can also bind to E- and L-selectin. PSGL-1 is a mucin-like, homodimeric, disulfide-bonded glycoprotein that is expressed on the surface of leukocytes (6). Studies have demonstrated that monoclonal antibodies against the NH₂ domain of PSGL-1 inhibit neutrophil aggregation, and prevent the tethering and rolling of neutrophils to P-selectin (7, 8).

rPSGL-Ig is a recombinant, soluble, Ig-fusion form of P-selectin glycoprotein ligand-1, which was developed as an antagonist to P- and E-selectin (9). The fusion protein was engineered by linking a truncated PSGL-1 to the Fc portion of human Ig. It has been shown that rPSGL-Ig can bind to P- and E-selectin expressed on platelets and endothelial cells. Recent studies have shown that rPSGL-Ig treatment protects rat steatotic liver grafts from I/R injury, attenuates infarct size and myeloperoxidase activity in a canine model of I/R, enhances thrombus resolution and decreases vein wall fibrosis in a rat model, and reduces severe I/R injury in rat kidney grafts (10-13).

Sirolimus (SIR), tacrolimus (TAC), cyclosporine (CsA), and mycophenolate mofetil (MMF) are small molecular weight immunosuppressants that are widely used for prevention of acute allograft rejection in clinic (14). SIR is a macrolide antibiotic that inhibits the phosphatidyl kinase activity of mammalian target of rapamycin (mTOR), a multifunctional protein responsible of regulating the state of phosphorylation of several receptors and enzymes of the cell cycle. Thus, SIR interferes with many pathways resulting in protein synthesis inhibition, decrease of gene transcription of cytokines, and inhibition of gene transcription of several regulator proteins of the cell cycle. TAC and CsA are calcineurin inhibitors that prevent T-lymphocyte immune responses through the blockade of the calcium-dependent signaling pathway. TAC and CsA inhibit the enzymatic activity of calcium/calmodulin-activated protein phosphatase calcineurin, which is required to activate the cytoplasmic component of transcription nuclear factor of activated T cell. Therefore, IL-2 gene transcription and production are inhibited. MMF is a semisynthetic derivative of the antimetabolic acid, and a potent, noncompetitive, reversible inhibitor of the enzyme inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH), which catalyzes the conversion of inosine to guanine or adenosine monophosphate during cell division of the S phase, a key step for purine biosynthesis.

The strategy of multiple immunosuppressive therapies using a proper combination of immunomodulatory/immunosuppressive agents is to enhance therapeutic efficacy while minimizing the toxicity of individual drugs used in the regimen. The aim of the present study was to evaluate the effect of an antagonist to P- and E-selectin, rPSGL-Ig, in combination with conventional immunosuppressants (SIR, TAC, MMF or CsA) to prevent of acute renal allograft rejection in the rat.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Adult male ACI (ACI, RT1^a) donor and Lewis (LEW, RT1^l) recipient rats were purchased from Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN), and Charles River (St-Constant, QC), respectively. Rodents were maintained in controlled light/dark cycles, pathogen free environment, and were allowed free access to water and chow. All procedures on animal were carried out in accordance with the Manual of Experimental Animal Care Guidelines, 2nd Edition, 1993.

Immunosuppressants

rPSGL-Ig and SIR were kindly obtained from Wyeth Research (Cambridge, MA), and MMF and TAC were donated from Roche (Palo Alto, CA) and Fujisawa Healthcare (Deerfield, IL), respectively. CsA (Neoral) was purchased from Novartis (Montreal, QC). rPSGL-Ig was kept in aliquots at -80°C until use, and diluted in sterile phosphate-buffered saline (PBS) prior to perfusion and injection at a concentration not less than 0.5 mg/ml. Respectively, SIR and CsA were diluted in pure olive oil, TAC in distilled water, and MMF in a vehicle containing benzyl alcohol, sodium chloride, sodium carboxymethylcellulose, and polysorbate 80.

Kidney transplantation

As previously described, kidney transplantation was performed following our previous publication (15). Briefly, the left kidney was perfused through the aorta with 4°C heparinized saline and harvested en bloc, after transecting the ureter, the renal artery close to aorta, and the renal vein near the vena cava. The kidney was preserved in 4°C Ringer's lactate solution for less than 30 min. The recipient was anesthetized and the left nephrectomy was performed after transecting the ureter, renal artery, and vein. End-to-end anastomoses of donor and recipient renal arteries and veins were performed using 10-0 nylon suture. After releasing the vascular clamps, an end-to-end

anastomosis of donor and recipient ureters was made using 10-0 nylon suture. Before closing the abdomen, the native right kidney of the recipient was removed. The time of rejection was defined as the last day before recipient's serum creatinine level exceeds 8 mg/dl, for two consecutive days. Animals that died within 3 days after transplantation (less than 5%) were excluded from analysis.

rPSGL-Ig treatment

The donor kidney was flushed in situ with 3 ml of cold lactated Ringers solution before removal and then stored transiently in the same cold solution (4°C) before engraftment. After the perfusion with 3 ml of cold lactated Ringers solution, rPSGL-Ig (50 µg in 0.1 ml PBS) was perfused slowly over 60 seconds, in situ, via the clamped aortic segment. An additional dose (50 µg in 0.1 ml PBS) was administered slowly after occluding the renal vein. The ureter was clamped to prevent any leakage via the ureteric vessels. The solution was retained in the isolated organ during the time needed to prepare the recipient (15 min). The organ is then removed and placed in 4°C cold Ringers solution. Total ischemia time was in range of 35–45 minutes. A second dose of rPSGL-Ig (100 µg in 0.2 ml PBS) was administered to recipient intravenously through the penal vein, prior to organ unclamping and reperfusion. Recipients from naïve control and monotherapy groups were subjected to same treatment, but with PBS only.

Design of experiment

LEW recipient rats received rPSGL-Ig pretreated ACI kidney graft and were treated with a single intravenous dose of rPSGL-Ig in combination with SIR (0.8 mg/kg/day), TAC (1 mg/kg/day), MMF (10 mg/kg/day), or CsA (4 mg/kg/day) daily by gavage for 3 days posttransplantation, according to the recipient's weight. Twelve groups (n≥5) were involved in the study.

Histopathology

Kidney specimens were fixed in a 10% buffered formalin solution and embedded in paraffin. Sections were made at 4 μm and stained with hematoxylin and eosin for histopathology evaluation. All sections were evaluated in a blinded manner.

Statistical analysis

For statistical analysis, recipient survivals were presented as mean survival time and standard deviation (MST \pm SD) with comparison among groups performed by Gehan's survival test.

RESULTS

Monotherapy of rPSGL-Ig, SIR, TAC, CsA, and MMF in prevention of acute renal allograft rejection

In untreated LEW recipient rats receiving ACI renal allograft, a mean survival time (MST \pm SD) of 7.5 ± 0.5 days was observed (Table 1). A treatment of rPSGL-Ig (100 μ g for pretreated allograft + 100 μ g for recipient's reperfusion) alone failed to prolong LEW recipient survival when compared to naïve control group (6.5 ± 0.8 days, $P=0.065$). In addition, a 3-day course treatment of low dose of SIR (0.8 mg/kg/day), TAC (1 mg/kg/day), CsA (4 mg/kg/day), or MMF (10 mg/kg/day) alone modestly extended recipient survival with an MST of 9.8 ± 2.1 days, $P=0.032$; 12.3 ± 5.0 days, $P=0.043$; 9.5 ± 2.1 days, $P=0.053$; and 8.2 ± 0.2 days, $P=0.200$; respectively, when compared with naïve controls.

Combination therapy of rPSGL-Ig with SIR, TAC, CsA, or MMF in prevention of acute renal allograft rejection

We investigated the effect of a combined use of rPSGL-Ig with conventional immunosuppressants in prevention of acute rejection in the rat. The combined therapy of rPSGL-Ig (100 μ g pretreated allograft + 100 μ g at recipient's reperfusion) with SIR, TAC, SIR plus TAC, or MMF did not significantly prolong recipient survival compared with respective monotherapy groups (Table 1): i) rPSGL-Ig + SIR (0.8 mg/kg/day), 9.4 ± 1.1 days, $P=0.605$; ii) rPSGL-Ig + TAC (1 mg/kg/day), 14.4 ± 7.5 days, $P=0.524$; iii) rPSGL-Ig + SIR (0.8 mg/kg/day) + TAC (1 mg/kg/day), 25.0 ± 29.4 days, $P=0.941$; iv) rPSGL-Ig + MMF (10 mg/kg/day), 9.6 ± 0.9 days, $P=0.003$. In contrast, a concomitant use of rPSGL-Ig with CsA (4 mg/kg/day) significantly prolonged LEW recipient survival to 50.8 ± 37.2 days, with 2 recipients surviving for more than 90 days, compared with monotherapy of CsA ($P=0.045$, Figure 1).

Reduction of morphological damage in renal allograft of recipient treated with the combined use of rPSGL-Ig with CsA

As shown in Figure 2, the combination therapy of rPSGL-Ig with CsA significantly reduced mononuclear cell infiltration, tubular obliteration, vascular congestion, oedema, and necrosis in long-term surviving recipients, compared with untreated controls. Although, mild focal cellular infiltrations were seen in rPSGL-Ig + CsA treated kidneys, there was no apparent sign of severe acute rejection. Renal function was normal as determined serum creatinine level (data not shown).

DISCUSSION

In this study, we evaluated whether a concomitant use of rPSGL-Ig with conventional immunosuppressants (SIR, TAC, MMF, or CsA) would prolong vascularized kidney allograft survival in the rat. Our results clearly demonstrated that a combined use of rPSGL-Ig with low dose of CsA significantly extended recipient survival when compared with each agent alone. However, a combination therapy of rPSGL-Ig with low doses of SIR, TAC or MMF failed to prolong LEW recipient survival compared with respective monotherapy.

It has been reported that rPSGL-Ig can reduce injury in many experimental I/R models. Recently, Amersi et al. have shown that rPSGL-Ig protects rat steatotic liver grafts via the blockade of CD62 selectin molecules (10). It has also been demonstrated that rPSGL-Ig reduces myocardial I/R injury in cats and attenuates infarct size and myeloperoxidase activity in a canine model (11, 16). Moreover, rPSGL-Ig treatment minimizes I/R injury after intestinal transplantation, and moderates local and remote injuries following experimental lower torso ischemia (17, 18). In kidney models, many groups have reported that rPSGL-Ig can improve renal graft function in rodents (13, 19, 20). In an elegant study, Kusaka et al., have demonstrated that a combination of recombinant soluble PSGL-Ig with low dose of CsA can significantly extend rat renal allograft survival for more than 200 days (21). The authors reported that a combined use of sPSGL-Ig with CsA significantly reduces inflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α) as well as infiltration of leukocyte population (CD4⁺, CD8⁺, ED-1⁺) in allografted kidneys, compared to CsA alone. We have shown that a combination therapy of rPSGL-Ig with CsA prolonged recipient survival to 50.8 ± 37.2 days. Nevertheless, in our study we used a fully allogeneic rat strain combination, while Kusaka et al. used a semiallogeneic rat strain (LBNF1 [RT1^{l/n}] \rightarrow LEW [RT1^l]) as renal allograft model. Furthermore, immunosuppression protocols were different. For instance, LEW recipients were treated daily with intravenous bolus of 50 μ g of sPSGL-Ig in combination with subcutaneous CsA 1.5 mg/kg/day, for 10 days.

In this study, we wanted to evaluate if a treatment of SIR, TAC or MMF combined with rPSGL-Ig would also prolong renal allograft survival, as demonstrated by Kusaka et al. with the combination therapy of rPSGL-Ig and CsA. For instance, we pretreated kidney allografts with rPSGL-Ig, and treated recipients with a single bolus of rPSGL-Ig in combination with a 3-day course treatment of low dose of SIR, TAC or MMF. Although, PSGL-1 interacts with all three selectin, rPSGL-Ig demonstrates the highest affinity for P-, followed by E-selectin, with L-selectin displaying the lowest affinity for this recombinant protein (4, 7). Griffin et al. have reported during the first 10–20 min after tissue injury, leukocyte rolling on the vascular endothelium is mainly mediated by P-selectin, with minimal L-selectin implication (5). However, after approximately 20 min, the role of P-selectin diminishes secondary to internal degradation, and L-selectin becomes the crucial mediator of leukocyte rolling. These data would imply that the optimal administration of a P- and E-selectin antagonist such as rPSGL-Ig to a recipient should be before or during the ischemic insult, and prior to reperfusion. E-selectin is exclusively expressed by activated endothelial cells in response to proinflammatory cytokines such as TNF and IL-1 (3). It has been reported by Wang et al. that in vitro expression of E-selectin after exposure of endothelial cells to TNF or IL-1 stimuli, peaks at 4 to 6 h, followed by a decline toward basal levels at 24 to 48 hrs (22). Moreover, the authors assessed the temporal expression of E-selectin in an in vivo model of skin flap I/R, and they demonstrated that E-selectin expression is maximal at one hr of reperfusion, declining thereafter. Theoretically, a single effective dose of rPSGL-Ig would be sufficient to modulate I/R injury, since its half-life is 100 ± 19 hrs in rats. However, a treatment of rPSGL-Ig alone failed to prolong recipient survival. This is most likely due to the fact that acute rejection is mainly triggered by immunological factors, although increasing studies have proved that non-immunological factors also play important roles in allograft rejection. By combining a single bolus of rPSGL-Ig with conventional immunosuppressants as anti-rejection treatment, we hypothesized that recipient survival would be prolonged since I/R injury, a non-immunological factor of acute rejection, would be decreased while

immunological factors such as MHC-mismatch related responses would also be reduced. However, with such protocol, indefinite allograft survival is unlikely to be achieved since immunosuppressants were administered at low dose, for a short period of 3 days. The main objective of this study was to identify which immunosuppressant would act synergistically with rPSGL-Ig to prevent acute rejection of renal allograft in the rat.

The surprising finding of the present study is that rPSGL-Ig only showed synergy with CsA, but not with SIR, TAC, or MMF, in prevention of acute rejection. CsA, SIR, TAC and MMF have all been demonstrated to reduce I/R injury. Nevertheless, only few papers have reported the protective property of MMF or SIR against I/R injury. MMF has been reported to protect rat hearts by minimizing leukocyte transmigration to the graft through inhibition of cell adhesion molecules glycosylation (23). SIR has been shown to reduce expression of fibrosis-associated genes in a model of I/R injury (24). On the other hand, calcineurin inhibitors have been extensively demonstrated to have such protective properties. CsA and TAC have been shown to minimize I/R injury by limiting polymorphonuclear leukocyte accumulation into the graft via different mechanisms such as inhibition of expression of mRNA coding for NF κ B, blockade of TNF production, or induction of heat shock protein 70 (25-28). Nevertheless, an additional and unique feature of CsA is that this immunosuppressant can prevent I/R injury by blocking mitochondrial permeability transition (MPT). It has been broadly reported that CsA inhibits MPT by blocking the interaction of cyclophilin-D with adenine nucleotide translocase (ANT), which is a crucial step for the opening of mitochondrial pore, and by inhibiting cyclophilin-D peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) activity (29, 30). Oxidative stress and ATP depletion induced by pathological conditions such as I/R favor the opening of the mitochondrial pore, thus causing MPT. MPT has been described to promote necroptosis, which is an MPT-related phenomenon of apoptotic or necrotic cellular death (31). It has been reported that CsA acts as a potent inhibitor of MPT and I/R injury in cardiac, hepatic and renal models (32-34). Recently, Daemen et al. have

reported that apoptosis and inflammation are central mechanisms leading to organ damage in the course of renal I/R in organ transplantation (35). Therefore, it is tempting to speculate that the synergy produced by the combination therapy of rPSGL-Ig with CsA to prolong allograft survival could be related to the synergy of these two agents to reduce I/R injury through distinct mechanisms of protection: rPSGL-Ig mainly prevents leukocytes infiltration into the graft, while CsA prevents necroptotic cell death via the blockade of MPT and neutrophil accumulation of the graft. Conversely, a plausible hypothesis of the finding that no synergy was seen between rPSGL-Ig and SIR, TAC or MMF, could be explained by the fact that these immunosuppressants have been shown to protect I/R injury by reducing leukocyte infiltration into the graft, a similar mechanism to rPSGL-Ig.

In this study, we have shown that a treatment of rPSGL-Ig (100 μ g at allograft pretreatment + 100 μ g at reperfusion) combined with a 3-day course treatment of CsA (4 mg/kg/day) significantly prolonged recipient survival, but not with SIR, TAC, or MMF. The combination therapy of rPSGL-Ig with CsA might be a potential therapeutic intervention in the transplantation of kidneys from non-heart beating cadaveric donors where kidneys are subjected to prolonged ischemic times, and effective in preventing early stages of acute rejection in renal transplantation. Increasing data reported that I/R injury play an important role in the development of chronic rejection, which is a major limitation to long-term success in solid organ transplantation. Actually, conventional immunosuppressive therapies fail to prevent or treat chronic rejection. A concomitant use of rPSGL-Ig with CsA may be an effective immunosuppressive treatment in prevention and treatment of both acute and chronic allograft rejection. Further investigations in rodents and non-human primates are indeed required to verify the efficacy of this combination therapy to prevent and treat graft vascular disease, commonly known as chronic rejection. In conclusion, our present study demonstrates that rPSGL-Ig shows synergy with CsA, but not with SIR, TAC, or MMF, in prevention of renal allograft in the rat. Results from this initial study warrant further investigation of the combination therapy of P-selectin antagonist with CsA as a

treatment to prevent allograft rejection in larger animal models, including non-human primates.

Acknowledgments. The authors thank Wyeth Research for providing grant support for this study, for the supply of rPSGL-Ig and SIR, and for decisive discussion.

REFERENCES

1. Daemen MARC, De Vries B, Buurman WA. Apoptosis and inflammation in renal reperfusion injury. *Transplantation* 2002; 73 (11): 1693-1700.
2. Fuggle SV, Koo DDH. Cell adhesion molecules in clinical renal transplantation. *Transplantation* 1998; 65 (6): 763.
3. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. Fourth Edition, Saunders, 2000.
4. Chamoun F, Burne M, O'Donnell M, Rabb H. Pathophysiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury. *Front Biosci* 2000; 5: E103-109.
5. Griffin JD, Spertini O, Ernst J, Belvin P, Levin B, Kanakura Y, Tedder TF. Granulocyte-macrophage colony-stimulation factor and other cytokines regulate surface expression of the leukocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils, monocytes, and their precursors. *J Immunol* 1990; 145:576-584.
6. Zimmerman GA. Two by two: The pairing of P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand 1. *PNAS* 2001; 98 (18): 10023-10024.
7. Norman KE, Moore KL, McEver RP, Ley K. Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand 1. *Blood* 1995; 86: 4417-4421.
8. Moore KL, Patel KD, Bruehl RE, Li F, Johnson DA, Lichenstein HS, Cummings RD, Bainton DF, McEver RP. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol* 1995; 128: 661-671.
9. Khor SP, McCarthy K, Dupont M, Murray K, Timony G. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, allometry, and dose selection of rPSGL-Ig for phase I trial. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293 (2): 618-624.
10. Amersi F, Farmer DG, Shaw GD, Kato H, Coito AJ, Kaldas F, Zhao D, Lassman CR, Melinek J, Ma J, Volk HD, Kupiec-Weglinski JW, Busuttil RW. P-selectin glycoprotein ligand-1 (rPSGL-Ig)-mediated blockade of CD62 selectin molecules protects rat steatotic liver grafts from ischemia/reperfusion injury. *Am J Transplant* 2002; 2(7): 600-8.

11. Wang K, Zhou Z, Tarakji K, Qin JX, Sitges M, Shiota T, Forudi F, Schaub RG, Kumar A, Penn MS, Topol EJ, Lincoff AM. Recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand-Ig (rPSGL-Ig) attenuates infarct size and myeloperoxidase activity in a canine model of ischemia-reperfusion. *Thromb Haemost* 2002; 88 (1): 149-54.
12. Myers DD Jr, Henke PK, Wroblewski SK, Hawley AE, Farris DM, Chapman AM, Knipp BS, Thanaporn P, Schaub RG, Greenfield LJ, Wakefield TW. P-selectin inhibition enhances thrombus resolution and decreases vein wall fibrosis in a rat model. *J Vasc Surg* 2002; 36 (5): 928-938.
13. Fuller TF, Sattler B, Binder L, Vetterlein F, Ringe B, Lorf T. Reduction of severe ischemia/reperfusion injury in rat kidney grafts by a soluble P-selectin glycoprotein ligand. *Transplantation* 2001; 72 (2): 216-222.
14. Hong JC, Kahan BK. Immunosuppressive agents in organ transplantation: past, present, future. *Semin Nephrol* 2000; 20 (2): 108-25.
15. Vu MD, Qi S, Xu D, Wu J, Peng J, Daloze P, Sehgal S, Leduc B, Chen H. Synergistic effects of mycophenolate mofetil and sirolimus in prevention of acute heart, pancreas, and kidney allograft rejection and in reversal of ongoing heart allograft rejection in the rat. *Transplantation* 1998; 66 (12): 1575-1580.
16. Hayward R, Campbell B, Shin YK, Scalia R, Lefer AM. Recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand-1 protects against myocardial ischemic reperfusion injury in cats. *Cardiovasc Res* 1999; 41 (1): 65-76.
17. Farmer DG, Amersi F, Shen XD, Gao F, Anselmo D, Ma J, Dry S, McDiarmid SV, Shaw G, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski J. Improved survival through the reduction of ischemia-reperfusion injury after rat intestinal transplantation using selective P-selectin blockade with P-selectin glycoprotein ligand-Ig. *Transplant Proc* 2002; 34 (3): 985.
18. Kyriakides C, Favuzza J, Wang Y, Austen WG Jr, Moore FD Jr, Hechtman HB. Recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand 1 moderates local and remote injuries following experimental lower-torso ischaemia. *Br J Surg* 2001; 88 (6): 825-830.

19. Pratschke J, Kofla G, Wilhelm MJ, Vergopoulos A, Laskowski I, Shaw GD, Tullius SG, Volk HD, Neuhaus P, Tilney NL. Improvements in early behavior of rat kidney allografts after treatment of the brain-dead donor. *Ann Surg* 2001; 234 (6): 732-740.
20. Takada M, Nadeau KC, Shaw GD, Marquette KA, Tilney NL. The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by a soluble P-selectin ligand. *J Clin Invest* 1997; 99 (11): 2682-2690.
21. Kusaka M, Zandi-Nejad K, Kato S, Beato F, Nagano H, Shaw GD, Tilney NL. Exploitation of the continuum between early ischemia/reperfusion injury and host alloresponsiveness: indefinite kidney allograft survival by treatment with a soluble P-selectin ligand and low-dose cyclosporine in combination. *Transplantation* 1999; 67 (9): 1255-1261.
22. Wang C, Kerrigan CL, Stotland M. Kinetics of E-selectin expression in surgical flaps. *Plast Reconstr Surg* 1997; 100 (6): 1482-1488.
23. Valentin JF, Bruijn JA, Paul LC. Donor treatment with mycophenolate mofetil: protection against ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transplantation* 2000; 69 (3): 344-350.
24. Jain S, Bicknell GR, Whiting PH, Nicholson ML. Rapamycin reduces expression of fibrosis-associated genes in an experimental model of renal ischaemia reperfusion injury. *Transplant Proc* 2001; 33 (1-2): 556-558.
25. Krishnadasan B, Naidu B, Rosengart M, Farr AL, Barnes A, Verrier ED, Mulligan MS. Decreased lung ischemia-reperfusion injury in rats after preoperative administration of Cyclosporine and Tacrolimus. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 123 (4): 756-767.
26. Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Saitta A, Deodato B, Arlotta M, Minutoli L, Quartarone C, Ferlito M, Caputi AP. Tacrolimus limits polymorphonuclear leucocyte accumulation and protects against myocardial ischaemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32 (3): 429-440.
27. Yang CW, Ahn HJ, Han HJ, Kim WY, Li C, Shin MJ, Kim SK, Park JH, Kim YS, Moon IS, Bang BK. Pharmacological preconditioning with low-dose cyclosporine or FK506

- reduces subsequent ischemia/reperfusion injury in rat kidney. *Transplantation* 2001; 72 (11): 1753-1759.
28. Ishii T, Kim YI, Tatsuma T, Kawano K, Kai T, Kobayashi M. Immunodepressants ameliorate normothermic ischemia injury to the rat liver by down-regulating tumor necrosis factor, not by alleviation of lipid peroxidative injury. *Transpl Int* 1994; 7 Suppl 1: S507-S511.
 29. Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury in the heart. *Biochimica et biophysica acta* 1998. 1366: 79-94.
 30. Clarke SJ, McStay GP, Halestrap AP. Sanglifehrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A. *J Biol Chem* 2002; 277 (38): 34793-34799.
 31. Lemasters JJ. Mechanisms of hepatic toxicity V. necroptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol* 1999; 39: G1-G6.
 32. Qian T, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in pH-dependent reperfusion injury to rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1997; 273 (6 Pt 1): C1783-C1792.
 33. Halestrap AP, Connern CP, Griffiths EJ, Kerr PM. Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* 1997; 174 (1-2): 167-172.
 34. McAnulty JF. The effect of calcium on hypothermia-facilitated resuscitation of warm ischemic kidney tissue slices: a role for the mitochondrial permeability transition pore? *Cryobiology* 1998; 36 (1): 12-19.
 35. Daemen MA, de Vries B, Buurman WA. Apoptosis and inflammation in renal reperfusion injury. *Transplantation* 2002; 73 (11): 1693-1700.

FIGURE LEGEND

FIGURE 1. Combination therapy of rPSGL-Ig with CsA in prevention of renal allograft acute rejection in the rat. A treatment of rPSGL-Ig (100 µg at harvest + 100 µg at reperfusion) combined with a 3-day course treatment of CsA (4 mg/kg/day) showed a significant prolongation of allograft survival compared with each agent alone (50.8 ± 37.2 days, $P=0.045$).

FIGURE 2. Histopathology evaluation of representative renal allograft from rPSGL-Ig + CsA treated recipient harvested at day 98. Hematoxylin and eosin stained sections of normal kidney (A), untreated allograft at day 6 (B), isograft at day 98 (C), and rPSGL-Ig + CsA treated allograft at day 98 (D) demonstrated that rPSGL-Ig + CsA treated group shows no sign of severe acute rejection as seen in untreated group (diffuse infiltrate of mononuclear cells, extensive obliteration of tubules, vascular congestion, oedema, and necrosis). However, mild focal mononuclear cell infiltrations were seen in rPSGL-Ig + CsA treated allograft (20X, $n = 2-3/\text{group}$).

TABLE 1. Evaluation of the combination therapy of rPSGL-Ig with SIR, TAC, MMF, or CsA in LEW recipient rats receiving ACI renal allograft

Group ^a	Survival (days) ^b	MST \pm SD	<i>P</i> ^d
1. Naïve control	7, 7, 7, 7, 8, 9	7.5 \pm 0.9	-
2. rPSGL-Ig	6, 6, 6, 6, 7, 8	6.5 \pm 0.8	0.065
3. SIR 0.8 mg/kg/day	8, 8, 9, 9, 12, 13	9.8 \pm 2.1	0.032
4. rPSGL-Ig + SIR 0.8 mg/kg/day	8, 9, 9, 10, 10, 10, 11	9.4 \pm 1.1	0.004
5. TAC 1.0 mg/kg/day	8, 8, 9, 9, 14, 19, 19	12.3 \pm 5.0	0.043
6. SIR 0.8 mg/kg/day + TAC 1.0 mg/kg/day	8, 9, 9, 10, 11, 11, 16, 32, 36, 39	18.1 \pm 12.4	0.086
7. rPSGL-Ig + SIR 0.8 mg/kg/day + TAC 1.0 mg/kg/day	9, 9, 11, 13, 15, 28, >90 ^c	25.0 \pm 29.4	0.221
8. rPSGL-Ig + TAC 1.0 mg/kg/day	8, 9, 10, 11, 14, 14, 15, 16, 33	14.4 \pm 7.5	0.044
9. CsA 4.0 mg/kg/day	8, 8, 8, 9, 11, 13	9.5 \pm 2.1	0.053
10. rPSGL-Ig + CsA 4.0 mg/kg/day	16, 17, 41, >90 ^c , >90 ^c	50.8 \pm 37.2	0.031
11. rPSGL-Ig + MMF 10 mg/kg/day	9, 9, 9, 10, 11	9.6 \pm 0.9	0.003
12. MMF 10 mg/kg/day	7, 8, 8, 9, 9	8.2 \pm 0.2	0.200

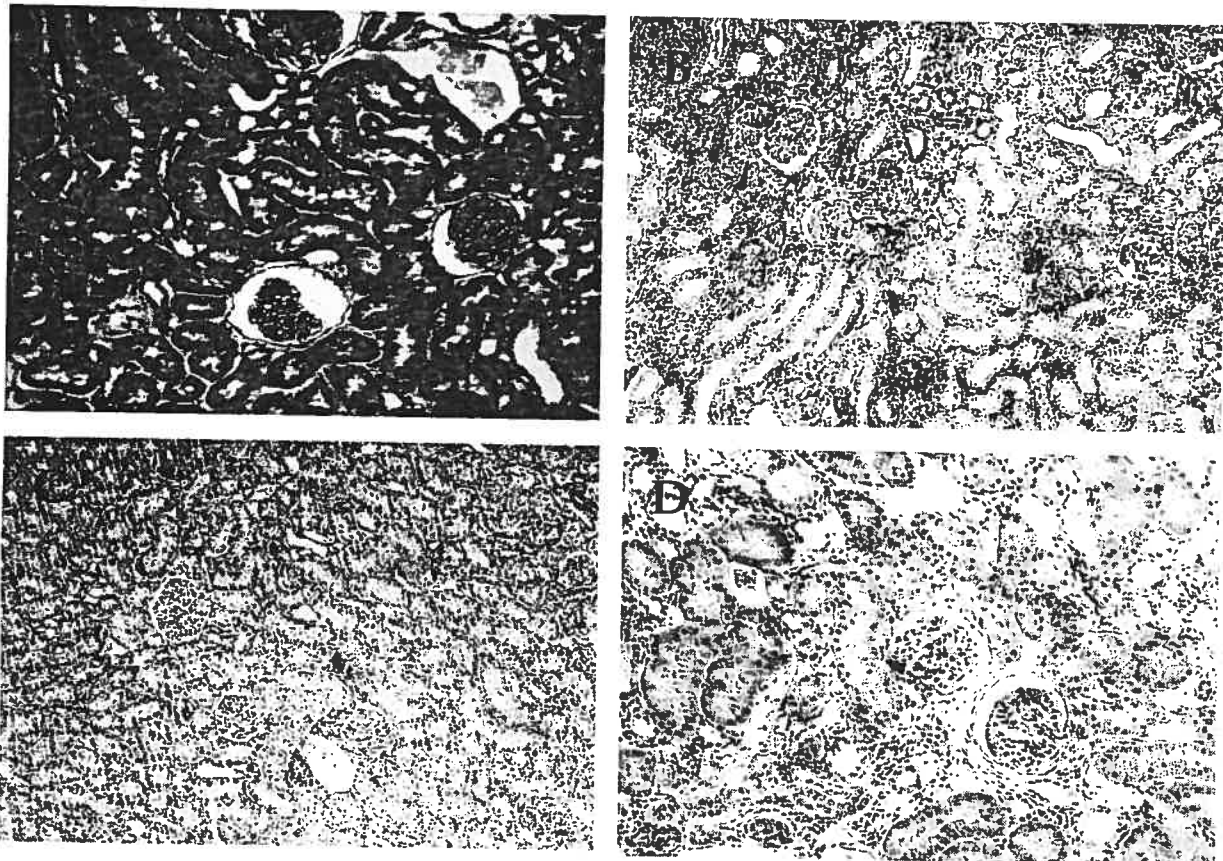
^a rPSGL-Ig was given as pretreatment of kidney allograft (100 μ g) + treatment of recipient (single bolus of 100 μ g) prior to reperfusion; SIR, TAC, MMF, and CsA were administered by gavage once daily for 3 days.

^b Rejection was defined as the last day before recipient death or sacrifice.

^c Long-term survival recipients were sacrificed at day 90: allograft histopathology and renal function were assessed.

^d Significantly prolonged compared with naïve control group ($P < 0.05$).

FIGURE 2



CHAPITRE VI

CRITIQUE DE LA MÉTHODOLOGIE ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

6.1 MANUSCRIT I

Critique de la méthodologie

Modèles expérimentaux: transplantation cardiaque, pancréatique et rénale. Le sirolimus et le mycophénolate mofétil sont des agents immunosuppresseurs de faible poids moléculaire qui ne causent pas la néphrotoxicité chez les patients transplantés, tel qu'observé avec une utilisation chronique ou à fortes doses d'inhibiteurs de la calcineurine. Puisque la néphrotoxicité est un obstacle majeur à la survie indéfinie des allogreffes rénales, voire au bon fonctionnement physiologique des patients transplantés, la recherche de thérapies alternatives, combinant des agents immunosuppresseurs efficaces avec un meilleur profil de toxicité, est devenue nécessaire. Bien que les études *in vitro* demeurent utiles quant à l'évaluation de nouveaux agents immunosuppresseurs, ils ne peuvent cependant pas représenter la réalité *in vivo*. En effet, nous avons rapporté que la thérapie combinée du tacrolimus et du sirolimus produit des effets synergiques dans la prévention et le traitement du rejet d'allogreffe cardiaque chez le rat (Vu et al., 1997), lorsque des études *in vitro* antérieures démontraient que ces agents agissent comme des antagonistes compétitifs réciproques chez les lymphocytes T (Dumont et al., 1990). En conséquence, un modèle expérimental *in vivo* demeure la référence pour évaluer une nouvelle thérapie immunosuppressive. Dans cette étude, nous avons utilisé la transplantation hétérotopique cardiaque, la transplantation hétérotopique pancréatique et la transplantation orthotopique rénale pour évaluer l'effet de la combinaison du sirolimus et du mycophénolate mofétil à prévenir et à traiter contre le rejet d'allogreffes vascularisées.

Tout d'abord, nous avons testé l'effet de cette thérapie immunosuppressive dans un modèle de transplantation hétérotopique cardiaque chez le rat, puisqu'il constitue une méthode simple et efficace. En effet, malgré qu'il exige une dextérité manuelle particulière, la transplantation cardiaque est le modèle expérimental le moins difficile à réaliser, techniquement. En outre, le modèle hétérotopique offre plusieurs avantages

comparativement au modèle orthotopique, qui consiste en une excision complète du cœur du receveur et un remplacement par le cœur du donneur. Or, une perfusion extracorporelle onéreuse et nécessitant la présence d'héparine dans le système circulatoire est obligatoire dans un modèle orthotopique. Les avantages du modèle hétérotopique incluent une faible mortalité chirurgicale chez le receveur, une réduction considérable des coûts, et une survie des receveurs après un rejet de greffe (Minanov et al., 1997). Une étude a démontré que l'œdème pulmonaire causé par la circulation extracorporelle demeure la cause majeure de mortalité chez des chiens receveurs ayant subi une transplantation orthotopique cardiaque (Sueda et al., 1990). Dans la transplantation hétérotopique, même si le cœur transplanté ne participe pas au fonctionnement du système cardiovasculaire du receveur, ceci n'est pas critique pour des études qui évaluent le rejet aigu d'allogreffe et les effets des immunosuppresseurs. En effet, la comparaison des résultats des études de transplantation orthotopique et hétérotopique chez le chien démontre que la pathologie des allogreffes cardiaques est semblable dans les deux modèles expérimentaux (Sueda et al., 1990). Or, la transplantation hétérotopique cardiaque chez le rat demeure un excellent modèle d'étude pour l'évaluation du rejet aigu et des agents immunosuppresseurs. Dès que la chirurgie est terminée, l'allogreffe cardiaque bat normalement et la fonction du cœur peut être détectée de façon simple et efficace par une palpation transabdominale et via des enregistrements électrocardiographiques (Chen, et al., 1995). Le receveur se rétablit peu de temps après l'intervention chirurgicale, et l'administration des agents immunosuppresseurs peut se faire dès le jour de la transplantation. La transplantation hétérotopique cardiaque intraabdominale a été adoptée par plusieurs groupes de recherche. Pour être considérée comme étant utile et efficace, en terme de temps et de coûts, une procédure chirurgicale doit être relativement simple et rapide à réaliser. La transplantation hétérotopique cardiaque rencontre toutes ces conditions.

Cependant, bien que la méthode de transplantation hétérotopique cardiaque soit bien indiquée pour l'évaluation de l'association du sirolimus et du mycophénolate

mofétil, elle comporte toutefois des inconvénients. Tout d'abord, lors de la vérification quotidienne de la fonction cardiaque, la méthode de palpations transabdominales est simple et adéquate, mais elle ne fournit pas de données histopathologiques, ni de données physiologiques (par exemple, des données électrophysiologiques) de l'allogreffe cardiaque. De plus, l'arrêt de la fonction contractile cardiaque n'est que l'interprétation du rejet intégral de l'allogreffe, et l'évolution du processus de rejet aigu ne peut être évaluée. En général, la palpation transabdominale est une méthode simple et efficace pour déterminer le jour du rejet terminal de l'allogreffe, lorsque la différence du temps de survie des allogreffes des divers groupes traités est évidente. Cependant, lorsqu'on s'attend à ce que la différence soit plus subtile, des méthodes plus objectives sont requises. Il existe des controverses dans la littérature concernant l'évaluation adéquate du rejet aigu dans un modèle de cœur hétérotopique. Mottram et al. (1988) ont étudié le rôle de l'électrocardiographie pour déterminer le temps de rejet chez le cœur hétérotopique transplanté chez la souris, et les auteurs ont conclu qu'une évaluation de la fonction cardiaque utilisant l'électrocardiogramme, la palpation transabdominale et l'histologie demeure la méthode la plus efficace pour définir le rejet de greffe. Néanmoins, Voiglio et al. (1995) ont rapporté que l'électrocardiographie n'est pas un bon moyen d'évaluation puisque l'examen clinique ne corrèle avec aucun des paramètres électrocardiographiques évalués. De plus, l'électrocardiographie est une technique difficile à effectuer en plus de requérir une anesthésie quotidienne. Plusieurs études ont rapporté que l'histopathologie est une méthode d'évaluation appropriée pour définir le rejet d'allogreffe cardiaque chez des patients (Billingham, 1981; Hammond et al., 1991; Herskowitz et al., 1987). Par contre, une étude a démontré que l'évaluation histologique ne constitue pas une méthode d'évaluation efficace du rejet d'allogreffe cardiaque puisque les données histologiques révélaient un stade avancé de rejet aigu malgré que l'allogreffe possédait toujours une fonction contractile détectable par palpation (Xu et al., 1992). Enfin, il faut mentionner que l'allogreffe cardiaque vascularisée ne subit pas de stress mécanique relié à la fonction contractile, et donc elle ne travaille pas autant qu'une allogreffe orthotopique cardiaque. Les paramètres

hémodynamiques cardiaques de l'allogreffe hétérotopique sont différents de ceux de l'allogreffe orthotopique. Il faut aussi préciser que la dénervation de l'allogreffe cardiaque est un facteur qui est inévitable dans les deux modèles. Ainsi, l'utilisation du modèle hétérotopique pour des études en cardioprotection doit tenir compte de ce fait, sachant que certains agents cardioprotecteurs peuvent jouer un rôle sur la composante nerveuse. Le modèle de transplantation hétérotopique cardiaque constitue donc un moyen adéquat pour vérifier l'efficacité de nouvelles thérapies immunosuppressives.

Le modèle de transplantation hétérotopique pancréatique utilisant des receveurs diabétiques est une technique beaucoup moins utilisée que la transplantation cardiaque ou rénale, mais elle est tout de même adéquate pour l'évaluation de l'efficacité des immunosuppresseurs. Il faut mentionner que le patron du rejet aigu est dépendant du type d'organe. Par exemple, le degré d'intensité et le temps auquel le rejet aigu survient est différent d'un organe à l'autre. Les organes qui sont normalement en contact avec des microorganismes, pathogènes et antigènes (par exemple, la peau et les organes des systèmes digestif et urinaire) sont beaucoup plus allogéniques que ceux dont la fonction physiologique normale n'implique pas la rencontre avec de tels agents antigéniques. Or, le pancréas est un organe (glande sécrétoire) du système digestif et la transplantation pancréatique implique souvent de greffer simultanément une section du duodénum (transplantation pancréaticoduodénale). Le degré d'intensité du rejet aigu observé dans l'allogreffe pancréatique est alors plus fort, et il se développe plus rapidement que dans une allogreffe cardiaque. Maki et al. (1977) ont rapporté que le degré d'intensité et le temps de rejet est beaucoup plus violent et rapide dans le foie et la rate, suivi du pancréas et ensuite du rein, suite à une transplantation semi-allogénique en bloc du foie-pancréas-duodénum-rate-rein. Il va sans dire que l'interprétation des résultats d'une évaluation d'agents immunosuppresseurs dans un modèle de transplantation pancréatique doit se faire en tenant compte du degré d'allogénicité de l'organe. Dans notre étude, on peut remarquer que le taux de survie des allogreffes pancréatiques est moindre que celui des allogreffes cardiaques ou rénales, malgré des doses équivalentes

d'agents immunosuppresseurs. Cependant, puisque nous avons évalué cette combinaison d'agents dans deux autres modèles d'allogreffes moins allogéniques, nous savons que l'association du sirolimus et du mycophénolate mofétil est efficace à prévenir et à traiter contre le rejet d'organe. Dans ce modèle expérimental, la survie de l'allogreffe pancréatique est évaluée via la détermination du taux de glucose sanguin (inférieur à 14 mmol/L) chez les receveurs rendus diabétiques, suite à un traitement à la streptozotocine. L'utilisation de la streptozotocine pour induire le diabète chez les rongeurs est une méthode efficace et très courante. Cependant, bien que ce modèle expérimental soit approprié pour des études d'immunosuppression, il comporte de légères faiblesses. En effet, puisque le taux de glucose sanguin n'est évalué que deux fois par semaine afin d'éviter de causer trop d'inconfort et de stress chez les receveurs transplantés, la détermination de la survie de l'allogreffe pancréatique n'est pas exacte. Également, la fonction pancréatique est corrélée à un facteur indirect, le glucose sanguin. Il serait plus adéquat d'évaluer l'insulinémie chez les receveurs diabétiques transplantés. Néanmoins, l'évaluation de l'insuline requiert une plus grande quantité de sang pour fins d'analyses biochimiques, comparativement à une faible quantité requise pour l'évaluation du glucose sanguin. Comme les prises sanguines doivent se faire de manière fréquente, une telle pratique n'est pas éthique chez des rongeurs puisque leur volume sanguin corporel est restreint.

En clinique, il existe une controverse à savoir quelle procédure médicale est plus appropriée pour traiter les patients atteints de diabète de type 1: la transplantation du pancréas total ou la transplantation des îlots pancréatiques? Actuellement, la transplantation pancréatique demeure toujours le traitement de choix, puisqu'elle procure de nombreux avantages importants, tels une glycémie normale à long terme, une meilleure fonction cardiaque et une réduction de la neuropathie autonome et périphérique (Allen et al., 2001). Cependant, la transplantation des îlots pancréatiques est une procédure prometteuse qui représente une alternative intéressante à la transplantation pancréatique. En plus d'être une procédure peu évasive et qui ne

comporte pas de complications chirurgicales, il est possible d'induire la tolérance suite à un prétraitement des cellules par thérapie génique. La disponibilité des cellules et tissus du donneur peut être illimitée avec des modèles de cultures cellulaires *in vitro* d'îlots pancréatiques, de lignées cellulaires génétiquement modifiées ou d'îlots pancréatiques xénogéniques (Hering et al., 2001). Le grand avantage de la transplantation des îlots pancréatiques demeure son côté sécuritaire associé à un faible taux de morbidité posttransplantation. Cependant, une telle méthode requiert une procédure exhaustive d'isolation des îlots pancréatiques. De plus, le succès d'une telle procédure est très variable et le rejet est difficile à évaluer. Malgré les résultats spectaculaires du groupe d'Edmonton (Shapiro et al., 2000), où 100% des patients (7/7) avaient une insulïnémie normale et stable après avoir reçu une transplantation des îlots pancréatiques, il n'en demeure pas moins que le taux de succès global de cette procédure est encore très faible. Enfin, compte tenu du fait que cette procédure nécessite normalement les îlots pancréatiques de deux donneurs compatibles pour un seul receveur, il est légitime de se questionner sur le rendement de cette méthode alternative.

Enfin, nous avons évalué la thérapie combinée du sirolimus et du mycophénolate mofétil dans un modèle de transplantation orthotopique rénale, utilisant une combinaison complètement allogénique BUF (RT1^b) → WFu (RT1^u). La transplantation rénale est le modèle expérimental de référence pour évaluer l'efficacité des agents immunosuppresseurs, puisque le rein est l'organe le plus souvent transplanté en clinique. Aux États-Unis, il s'effectue annuellement plus 10,000 transplantations rénales, voire près de 1,000 au Canada dont plus de 200 transplantations rénales au Québec (UNOS, 2002; Canadian Association of Transplantation, 2002). Dans cette étude, nous avons utilisé le modèle de transplantation orthotopique rénale chez le receveur nephrectomisé. Dans ce modèle expérimental, le rejet de l'allogreffe rénale est défini comme étant la mort ou le sacrifice du receveur dont l'état de santé s'est détérioré, puisque l'animal ne possède qu'un seul rein. Normalement, une défaillance rénale non traitée engendre la mort de l'animal dans les heures qui suivent. Or, il est important de

noter qu'une évaluation macroscopique de l'allogreffe est nécessaire pour confirmer que l'allogreffe est bel et bien rejetée, puisque la mort de l'animal peut être due à une cause autre que le rejet aigu (par exemple, la toxicité létale d'un agent ou une mauvaise technique chirurgicale). Néanmoins, cette méthode d'évaluation n'est pas idéale et demeure peu éthique puisque la fonction de l'allogreffe rénale est corrélée à un facteur indirect, la mort du receveur. Il serait plus adéquat d'évaluer le taux de créatinine plasmatique chez les receveurs transplantés, et de déterminer qu'il y a rejet de l'allogreffe lorsque le taux de créatinine plasmatique chez les receveurs est nettement supérieur au niveau normal. Néanmoins, l'évaluation de créatinine requiert d'effectuer des prises sanguines pour fins d'analyses biochimiques. Cependant, les prises sanguines doivent être faites de manière fréquente, et une telle pratique n'est pas éthique chez des rongeurs qui possèdent un petit volume sanguin corporel. De plus, les prises sanguines chez les rats receveurs, surtout celles effectuées dans les jours qui suivent la transplantation, peuvent nuire à la récupération de l'animal puisqu'elles causent un stress physique supplémentaire. En outre, il existe une controverse dans le modèle d'allogreffe rénale. Certains groupes préfèrent garder le rein natif controlatéral du receveur pendant les trois jours qui suivent la transplantation, et l'enlever par la suite, pour laisser le temps à l'allogreffe de s'adapter et de fonctionner de manière stable. Dans notre modèle expérimental, nous préférons enlever le rein natif controlatéral immédiatement après avoir transplanté l'allogreffe rénale, puisque nous considérons que deux anesthésies générales effectuées sur une courte période de temps peuvent nuire à la récupération postopératoire du receveur.

Principe de l'effet médian et index de combinaison: méthode d'évaluation d'une interaction synergique, additive ou antagoniste. Dans cette étude où nous évaluons l'interaction entre le sirolimus et le mycophénolate mofétil, le principe de l'effet médian et la méthode d'index de combinaison sont utilisés afin de déterminer le type d'interaction entre ces deux agents, c'est-à-dire la synergie ($CI < 1$), l'additivité ($CI = 1$) ou l'antagonisme ($CI > 1$). La méthode d'index de combinaison demeure l'outil de

choix pour évaluer l'interaction entre les agents immunosuppresseurs puisqu'elle tient compte de plusieurs paramètres biochimiques en plus de ne pas posséder de limites d'utilisation. Contrairement aux approches empiriques et statistiques, cette approche physicochimique se réfère à des modèles bien définis pour des déviations mathématiques lors de l'analyse des courbes dose-effet en biologie. La formule de l'effet médian a été démontrée comme étant très appropriée pour déterminer les interactions entre les agents immunosuppresseurs. Après avoir déterminé le type d'interaction d'une association de deux agents, un point additionnel à évaluer est de savoir à quelle intensité est la relation synergique ou antagoniste. Pour répondre à cette question, plusieurs points doivent être considérés comme l'exactitude des mesures, la viabilité biologique et les conditions expérimentales (par exemple, la température, la pression d'oxygène, et le pH), qui peuvent affecter les résultats et les conclusions. Un tableau descriptif du niveau de synergie, d'additivité et d'antagonisme a été élaboré afin de déterminer de façon adéquate la relation qui existe entre les agents associés (Tableau 6.1.1; Chou, 1991). Dans cette étude, nous avons déterminé la courbe dose-réponse de chaque agent dans les trois modèles expérimentaux. Cependant, la plupart des courbes dose-réponse n'incluent que deux doses différentes. Or, la règle stipule que plus une courbe dose-réponse comporte des doses différentes, meilleure sera la corrélation entre l'agent et l'effet. Il serait alors plus approprié d'inclure au moins trois doses différentes pour chaque courbe puisque le facteur de corrélation serait plus juste. Par exemple, dans le cas où l'effet d'un agent est saturé à une certaine dose, et que sa courbe dose-réponse représente un plateau, il est indéniable que si on n'évalue que deux doses, on risque de croire faussement que cet agent possède une courbe dose-réponse de type linéaire au lieu d'une courbe de type sigmoïdal avec un plateau de saturation. Dans une telle situation, on risque de sous-estimer le type d'interaction entre les agents évalués (par exemple, on peut croire que c'est une interaction faiblement synergique alors qu'elle est en réalité fortement synergique).

Bien que le principe de l'effet médian et l'index de combinaison soient clairement définis par ses auteurs, son utilisation est plutôt restreinte dans les études de transplantation utilisant des modèles *in vivo*. Ceci est sûrement dû au fait que les courbes dose-réponse de chaque agent doivent être évaluées afin de pouvoir appliquer ce principe de façon adéquate pour évaluer l'interaction entre les agents immunosuppresseurs. Cela implique beaucoup d'effort, de temps et d'argent, et on ne peut blâmer les scientifiques qui préfèrent utiliser la bonne vieille méthode de l'observation et du bon sens pour juger si une interaction semble bénéfique ou pas. Il va sans dire que si une interaction synergique entre deux agents est évidente, le principe de l'effet médian est idéal mais pas nécessaire. Par exemple, dans notre étude, les groupes de transplantation rénale traités avec la combinaison du sirolimus et du mycophénolate mofétil possèdent une survie d'allogreffe significativement prolongée comparativement aux groupes de monothérapie (SIR 0.2 mg + MMF 10 mg: 59.0 ± 2.4 jours *versus* SIR 0.2 mg: 10.0 ± 2.2 jours ou MMF 10 mg: 13.5 ± 4.0 jours). Nous avons appliqué le principe de l'effet médian pour évaluer le type d'interaction puisque cela faisait partie de l'objectif de notre étude, mais nul besoin d'utiliser ce principe pour affirmer avec certitude que la combinaison du sirolimus et du mycophénolate mofétil produit des effets synergiques dans le modèle d'allogreffe rénale. Par contre, quand on regarde les résultats avec les groupes de transplantation pancréatique, la prolongation de la survie des allogreffes est beaucoup plus subtile, et il est alors difficile d'émettre une quelconque conclusion sans avoir utilisé le principe de l'effet médian (SIR 0.2 mg + MMF 20 mg: 26.3 ± 8.4 jours *versus* SIR 0.2 mg: 14.5 ± 1.4 jours ou MMF 20 mg: 20.8 ± 7.8 jours). Or, le principe de l'effet médian est nécessaire, et il beaucoup plus utile dans un tel cas.

Interprétation des résultats

Tel que rapporté dans le second chapitre de cette thèse de doctorat, en référence au manuscrit I, nous avons démontré que la thérapie combinée du sirolimus et du mycophénolate mofétil produit des effets synergiques dans la prévention du rejet aigu

des allogreffes cardiaques, rénales, et pancréatiques, voire dans le traitement du rejet aigu installé d'allogreffe cardiaque chez le rat.

Prévention et traitement du rejet d'allogreffe cardiaque. Tout d'abord, nous avons évalué l'effet de la thérapie combinée du sirolimus et du mycophénolate mofétil dans la prévention du rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez le rat. Puisque nous avons utilisé le principe de l'effet médian pour déterminer le type d'interaction entre ces deux agents, il a fallu établir la courbe dose-réponse de chaque agent, voire évaluer l'efficacité du sirolimus et du mycophénolate mofétil en monothérapie. Dans le groupe témoin non-traité, la survie de l'allogreffe cardiaque est de 6.5 ± 0.6 jours. Lorsqu'un traitement à faible dose de sirolimus seul (0.2 mg/kg/jour) est administré pour une période de 30 jours, le temps de survie des allogreffes a augmenté significativement jusqu'à 19.2 ± 2.0 jours, comparativement au groupe témoin ($P < 0.001$; Figure 6.1.1). Par ailleurs, nous avons augmenté les doses de sirolimus à 0.4 mg/kg/jour, 0.8 mg/kg/jour et 1.2 mg/kg/jour, et les temps de survie des allogreffes ont augmenté jusqu'à 30.0 ± 7.3 jours, 50.8 ± 12.5 jours, et 51.2 ± 2.6 jours, respectivement (Figure 6.1.1). Ces résultats suggèrent que le sirolimus est efficace pour prévenir contre le rejet aigu d'allogreffe cardiaque, et ce même à de très faibles doses (0.2 mg/kg/jour). L'efficacité immunosuppressive du sirolimus est dose-dépendante et sa courbe dose-réponse est de type sigmoïdal (Figure 6.1.1). Par ailleurs, l'effet du sirolimus à prolonger la survie des allogreffes semble plafonner autour de 50 jours, tel qu'observé avec les doses de 0.8 mg/kg/jour et 1.2 mg/kg/jour de sirolimus. Nous avons ensuite évalué l'effet du mycophénolate mofétil. Lorsqu'un traitement à faible dose de mycophénolate mofétil seul (10 mg/kg/jour et 20 mg/kg/jour) est administré pour une période de 30 jours, le temps de survie des allogreffes a augmenté de façon significative jusqu'à 12.5 ± 2.6 jours ($P < 0.001$) et 19.3 ± 9.0 jours ($P < 0.001$), respectivement, comparativement au groupe témoin (Figure 6.1.2). Ces résultats suggèrent que le mycophénolate mofétil est efficace pour prévenir contre le rejet aigu des allogreffes cardiaques, mais son efficacité est moindre que le sirolimus. En outre, l'efficacité immunosuppressive du mycophénolate

mofétil est dose-dépendante et sa courbe dose-réponse est de type linéaire. Il serait par contre plus approprié d'évaluer des doses supplémentaires de mycophénolate mofétil afin de déterminer celles qui correspondent à une saturation de l'effet.

Pour évaluer la thérapie combinée du sirolimus et du mycophénolate mofétil à prévenir contre le rejet aigu d'allogreffe cardiaque, nous avons utilisé des faibles doses de sirolimus (0.2 et 0.4 mg/kg/jour) et de mycophénolate mofétil (10 et 20 mg/kg/jour), afin d'avoir la possibilité de démontrer une interaction synergique ou additive entre ces agents. En utilisant de faibles doses, nous avons voulu observer le phénomène du rejet aigu chez les allogreffes, et non pas induire une survie indéfinie. Comme le temps de survie est évalué à un maximum de 60 jours, il ne fallait pas que les doses de sirolimus et de mycophénolate mofétil soient trop élevées. Lorsque les rats receveurs LEW sont traités pendant 30 jours avec une association de faibles doses de sirolimus et de mycophénolate mofétil de ratio 0.1:5 (SIR 0.2 mg/kg/jour + MMF 10 mg/kg/jour), le temps de survie des allogreffes a augmenté significativement jusqu'à 52.7 ± 5.7 jours ($P < 0.001$), lorsque comparé aux groupes de monothérapie au sirolimus 0.2 mg/kg/jour (19.2 ± 2.0 jours) ou au mycophénolate mofétil 10 mg/kg/jour (12.5 ± 2.6 jours) (Figure 6.1.3a). Selon le principe de l'effet médian et la méthode d'index de combinaison, l'interaction entre le sirolimus et le mycophénolate mofétil, à ces faibles doses et de ratio 0.1:5, est fortement synergique ($CI=0.189$). De plus, un traitement de sirolimus (0.2 mg/kg/jour) combiné au mycophénolate mofétil (20 mg/kg/jour) a prolongé la survie des allogreffes de manière très fortement synergique jusqu'à 57.7 ± 5.7 jours, comparativement à chaque agent seul ($P < 0.001$, $CI=0.084$) (Figure 6.1.3a). Dans la figure 6.1.3b, on peut observer qu'un traitement de sirolimus (0.4 mg/kg/jour) et de mycophénolate mofétil (10 mg/kg/jour) a prolongé de façon synergique la survie des allogreffes cardiaques à 50.2 ± 13.5 jours ($CI=0.453$). De plus, un traitement de sirolimus (0.4 mg/kg/jour) et de mycophénolate mofétil (20 mg/kg/jour) a prolongé de manière synergique la survie des allogreffes à 51.5 ± 6.8 jours ($CI=0.453$). Il est important de noter que puisque la survie des allogreffes est évaluée jusqu'à un maximum de 60 jours,

les valeurs de survie des groupes de combinaison sont plafonnées. Il se peut fort bien que le temps de survie dans ces groupes de combinaison soit davantage prolongé, voire que le degré de synergie soit encore plus fort.

Dans un second temps, nous avons évalué l'effet de la thérapie combinée du sirolimus et du mycophénolate mofétil dans le traitement du rejet aigu installé de l'allogreffe cardiaque chez le rat. Pour vérifier si l'association du sirolimus et du mycophénolate mofétil est efficace pour renverser un rejet aigu déjà présent et installé, nous avons traité les rats receveurs LEW quatre jours après la transplantation, pour une période de 30 jours, c'est-à-dire jusqu'au jour 34. Comme les allogreffes non-traitées ont une survie de 6.5 ± 0.6 jours, nous pouvons ainsi déduire que le processus de rejet est à un stade modéré au jour 4. Les allogreffes des rats receveurs ayant reçu un traitement à des faibles doses de sirolimus seul (0.2 et 0.4 mg/kg/jour) ou de mycophénolate mofétil seul (10 et 20 mg/kg/jour) avaient un temps de survie augmenté de façon significative jusqu'à 11.7 ± 2.4 jours ($P < 0.001$) et 27.2 ± 8.5 jours ($P < 0.001$), respectivement pour le sirolimus, et 10.8 ± 0.8 jours ($P < 0.01$) et 24.3 ± 6.2 jours ($P < 0.001$), respectivement pour le mycophénolate mofétil (Figures 6.1.4 et 6.1.5). Lorsque les allogreffes cardiaques sont traitées avec la combinaison de ces deux agents (sirolimus 0.2 mg/kg/jour + mycophénolate mofétil 10 mg/kg/jour et sirolimus 0.2 mg/kg/jour + mycophénolate mofétil 20 mg/kg/jour), le temps de survie est prolongé de manière synergique jusqu'à 35.5 ± 16.0 jours et 57.2 ± 4.7 jours, respectivement, comparativement aux groupes de monothérapie ($P < 0.001$; Figure 6.1.6). Dans les deux groupes, l'interaction entre le sirolimus et le mycophénolate mofétil est synergique, comme le témoignent les valeurs de $CI=0.794$ et $CI=0.310$, respectivement.

Prévention du rejet d'allogreffe pancréatique. Nous avons ensuite évalué cette combinaison dans le modèle d'allogreffe pancréatique chez le rat. Dans le groupe témoin non-traité, la survie de l'allogreffe pancréatique est de 9.2 ± 2.6 jours. Lorsqu'un traitement à faibles doses de sirolimus seul (0.2 et 0.4 mg/kg/jour) est administré pour

une période de 30 jours, le temps de survie des allogreffes a augmenté significativement jusqu'à 14.5 ± 1.4 jours ($P < 0.001$) et 17.3 ± 6.7 jours ($P < 0.02$), respectivement, comparativement au groupe témoin (Figure 6.1.7). Ces résultats suggèrent que le sirolimus est efficace pour prévenir contre le rejet aigu de l'allogreffe pancréatique. L'efficacité immunosuppressive du sirolimus est dose-dépendante et sa courbe dose-réponse est de type linéaire. Il serait par contre plus approprié d'évaluer des doses supplémentaires de sirolimus afin de déterminer celles qui correspondent à une saturation de l'effet (Figure 6.1.7). Nous avons ensuite évalué l'effet du mycophénolate mofétil. Lorsqu'un traitement à faible dose de mycophénolate mofétil seul (10 mg/kg/jour et 20 mg/kg/jour) est administré pour une période de 30 jours, le temps de survie des allogreffes a augmenté de façon significative jusqu'à 13.3 ± 2.8 jours ($P < 0.02$) et 20.8 ± 7.7 jours ($P < 0.005$), respectivement, comparativement au groupe témoin (Figure 6.1.8). Ces résultats suggèrent que le mycophénolate mofétil est efficace pour prévenir contre le rejet aigu des allogreffes pancréatiques. En outre, l'efficacité immunosuppressive du mycophénolate mofétil est dose-dépendante et sa courbe dose-réponse est de type sigmoïdale. Il serait par contre plus juste d'inclure des doses supplémentaires de mycophénolate mofétil pour construire la courbe dose-réponse.

Nous avons ensuite évalué la thérapie combinée du sirolimus et du mycophénolate mofétil à prévenir contre le rejet aigu d'allogreffe pancréatique. Lorsque les rats receveurs LEW sont traités pendant 30 jours avec une association de faibles doses de sirolimus et de mycophénolate mofétil (SIR 0.2 mg/kg/jour + MMF 10 mg/kg/jour), la survie des allogreffes a augmenté jusqu'à 17.0 ± 2.6 jours (Figure 6.1.9). Selon le principe de l'effet médian et la méthode d'index de combinaison, l'interaction entre le sirolimus et le mycophénolate mofétil à ces doses est plutôt additive (CI=1.108). De plus, un traitement de sirolimus (0.2 mg/kg/jour) combiné au mycophénolate mofétil (20 mg/kg/jour) a prolongé la survie des allogreffes de manière modérément synergique jusqu'à 26.3 ± 8.4 jours (CI=0.726) (Figure 6.1.9).

Prévention du rejet d'allogreffe rénale. Enfin, nous avons ensuite évalué la thérapie combinée du sirolimus et du mycophénolate mofétil dans le modèle d'allogreffe rénale chez le rat. Dans le groupe témoin non-traité, la survie de l'allogreffe rénale est de 7.7 ± 0.8 jours. Lorsqu'un traitement à faibles doses de sirolimus seul (0.2 et 0.4 mg/kg/jour) est administré pour une période de 30 jours, la survie des allogreffes a augmenté significativement jusqu'à 10.0 ± 2.2 jours ($P < 0.03$) et 14.4 ± 7.5 jours ($P < 0.05$), respectivement, comparativement au groupe témoin (Figure 6.1.10). Ces résultats suggèrent que le sirolimus est efficace pour prévenir contre le rejet aigu de l'allogreffe rénale. L'efficacité immunosuppressive du sirolimus est dose-dépendante et sa courbe dose-réponse est de type linéaire. Cependant, il serait plus adéquat d'évaluer des doses supplémentaires de sirolimus afin de déterminer celles qui causent une saturation de l'effet (Figure 6.1.10). En outre, lorsqu'un traitement à faible dose de mycophénolate mofétil seul (10 mg/kg/jour et 20 mg/kg/jour) est administré pour une période de 30 jours, la survie des allogreffes rénales a augmenté de façon significative jusqu'à 13.5 ± 4.0 jours ($P < 0.006$) et 18.5 ± 5.5 jours ($P < 0.001$), respectivement, comparativement au groupe témoin (Figure 6.1.11). Ces résultats suggèrent que le mycophénolate mofétil est efficace pour prévenir contre le rejet aigu des allogreffes rénales chez le rat. En outre, l'efficacité immunosuppressive du mycophénolate mofétil est dose-dépendante et sa courbe dose-réponse est de type sigmoïdale. Néanmoins, il serait plus juste d'inclure des doses supplémentaires de mycophénolate mofétil lors de l'élaboration de la courbe dose-réponse.

Par la suite, nous avons évalué la thérapie combinée du sirolimus et du mycophénolate mofétil à prévenir contre le rejet aigu d'allogreffe rénale chez le rat. Tel que représenté à la Figure 6.1.12, lorsque les receveurs LEW sont traités pendant 30 jours avec une association de faibles doses de sirolimus et de mycophénolate mofétil (SIR 0.2 mg/kg/jour + MMF 10 mg/kg/jour), la survie des allogreffes a augmenté de manière très fortement synergique jusqu'à 59.0 ± 2.4 jours ($CI = 0.001$). De plus, un traitement de sirolimus (0.2 mg/kg/jour) combiné au mycophénolate mofétil (20

mg/kg/jour) a également prolongé la survie des allogreffes de façon très fortement synergique jusqu'à 59.2 ± 1.2 jours (CI=0.0001).

TABLEAU 6.1.1. Interprétation du degré de synergie et d'antagonisme dans des études de combinaison d'agents selon la méthode d'index de combinaison

Intervalle d'index de combinaison (CI)	Description
<0.10	Très forte synergie
0.10 - 0.30	Forte synergie
0.30 - 0.70	Synergie
0.70 - 0.85	Synergie modérée
0.85 - 0.90	Légère synergie
0.90 - 1.10	Plutôt additif
1.10 - 1.20	Léger antagonisme
1.20 - 1.45	Antagonisme modéré
1.45 - 3.30	Antagonisme
3.30 - 10	Fort antagonisme
>10	Très fort antagonisme

La méthode d'index de combinaison est basée sur les descriptions de Chou et Talalay (1977, 1981) et le logiciel Calcosyn (1996). $CI < 1$, $CI = 1$ et $CI > 1$ indiquent respectivement la synergie, l'additivité et l'antagonisme.

FIGURE 6.1.1. Courbe dose-réponse du sirolimus dans la prévention du rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez le rat (BN → LEW)

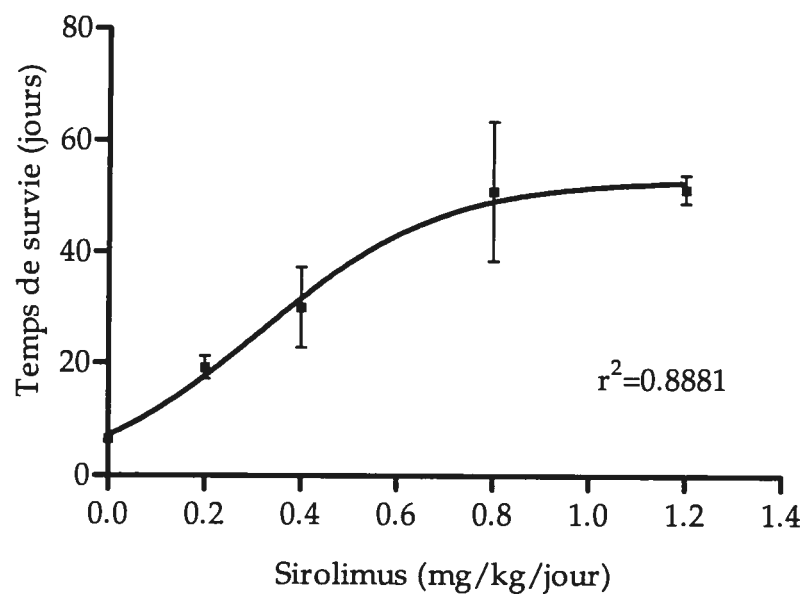


FIGURE 6.1.2. Courbe dose-réponse du mycophénolate mofétil dans la prévention du rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez le rat (BN → LEW)

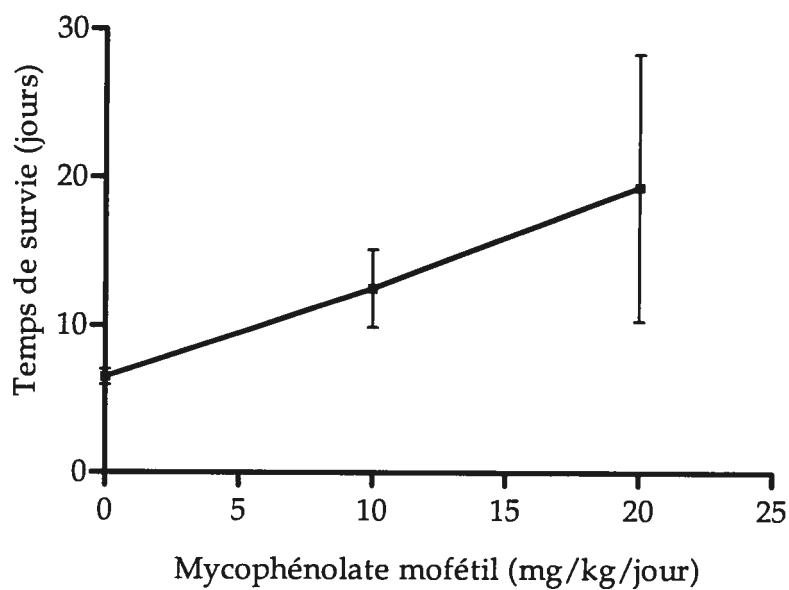


FIGURE 6.1.3a. Effet de la combinaison du sirolimus et du mycophénolate mofétil dans la prévention du rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez le rat (BN → LEW)

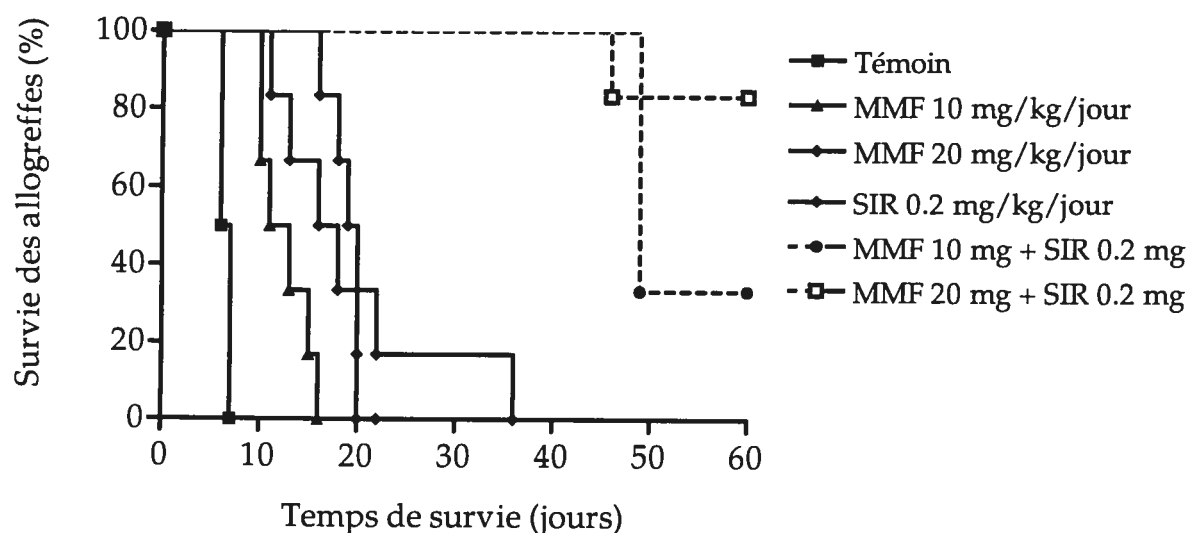


FIGURE 6.1.3b. Effet de la combinaison du sirolimus et du mycophénolate mofétil dans la prévention du rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez le rat (BN → LEW)

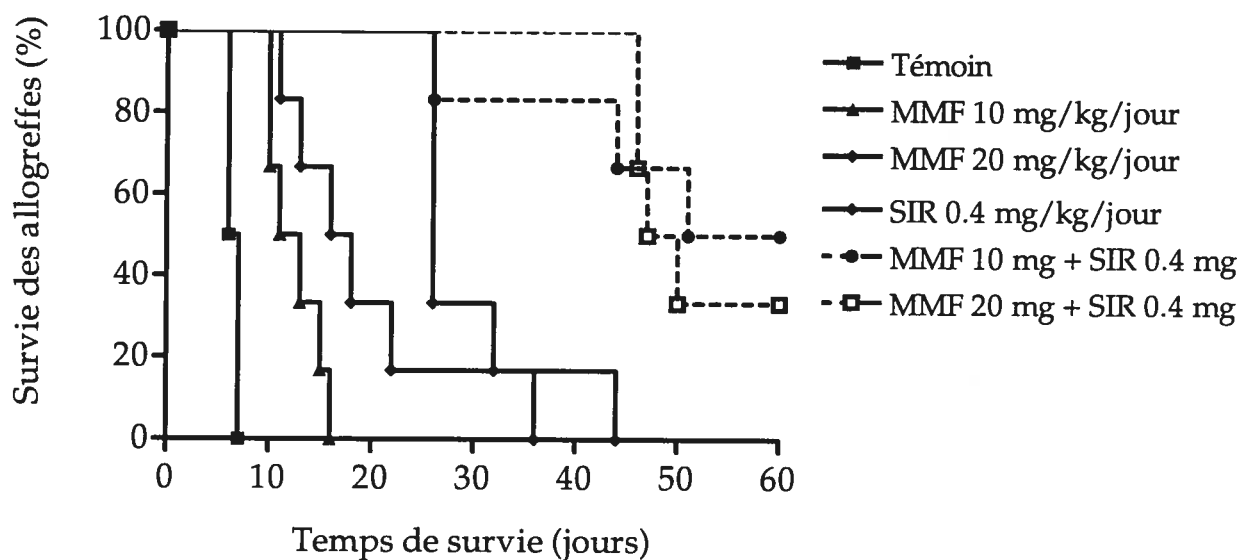


FIGURE 6.1.4. Courbe dose-réponse du sirolimus dans le traitement du rejet aigu installé de l'allogreffe cardiaque chez le rat (BN → LEW)

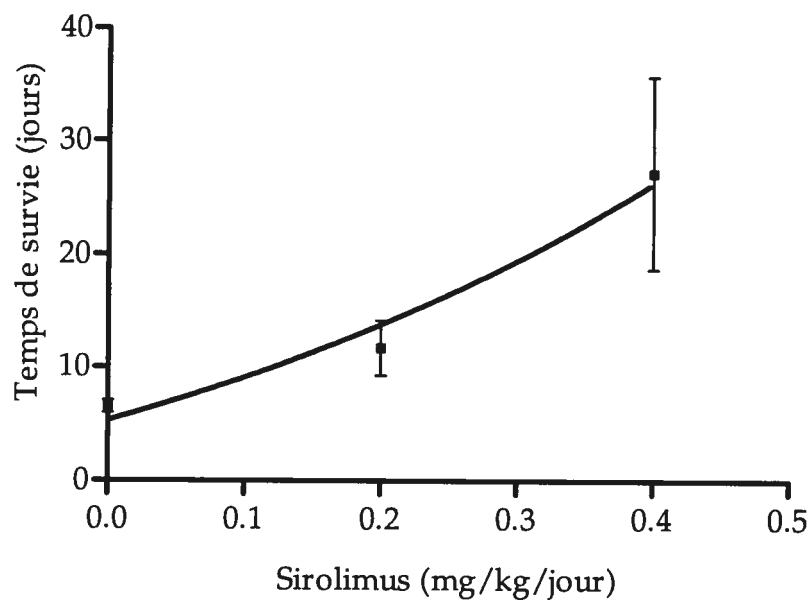


FIGURE 6.1.5. Courbe dose-réponse du mycophénolate mofétil dans le traitement du rejet aigu installé de l'allogreffe cardiaque chez le rat (BN → LEW)

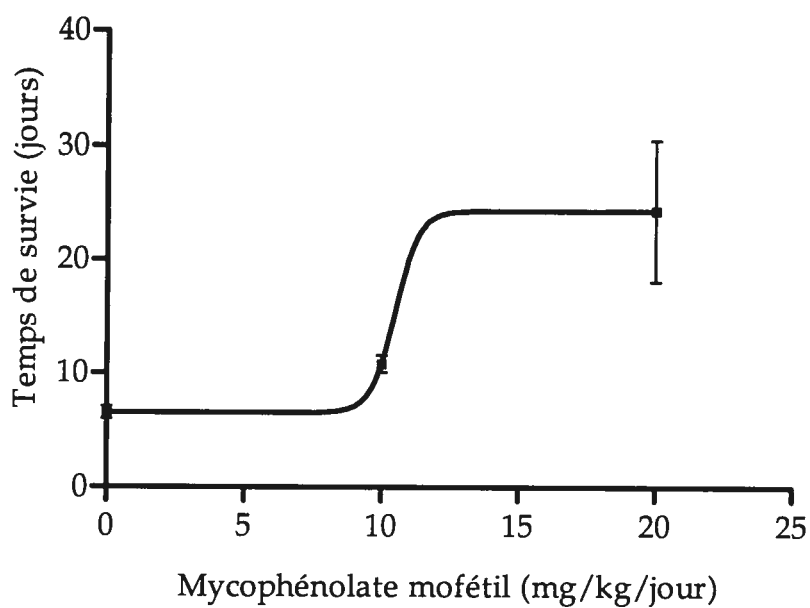


FIGURE 6.1.6. Effet de la combinaison du sirolimus et du mycophénolate mofétil dans le traitement du rejet aigu installé de l'allogreffe cardiaque chez le rat (BN → LEW)

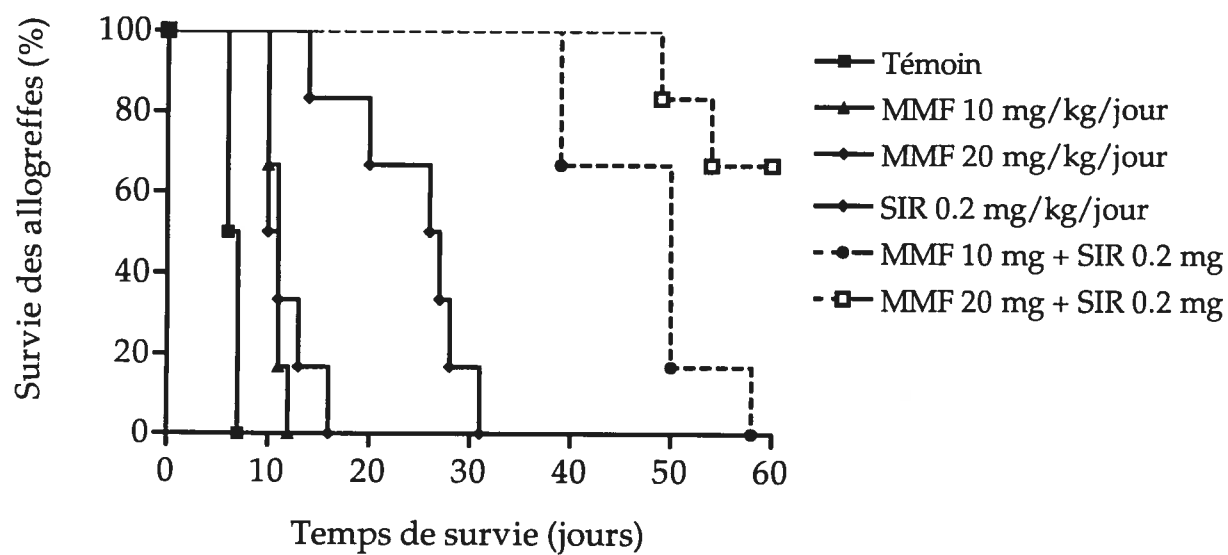


FIGURE 6.1.7. Courbe dose-réponse du sirolimus dans la prévention du rejet aigu de l'allogreffe pancréatique chez le rat (BN → LEW)

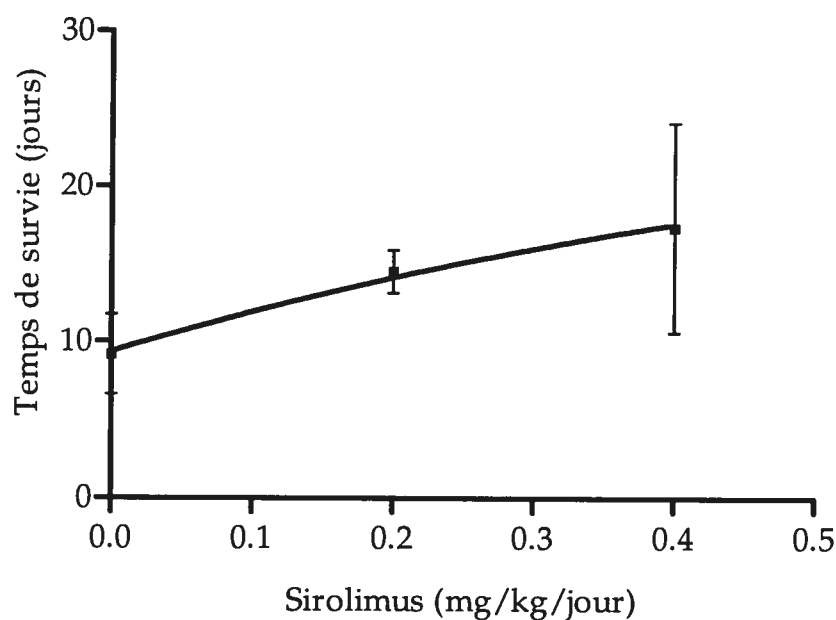


FIGURE 6.1.8. Courbe dose-réponse du mycophénolate mofétil dans la prévention du rejet aigu de l'allogreffe pancréatique chez le rat (BN → LEW)

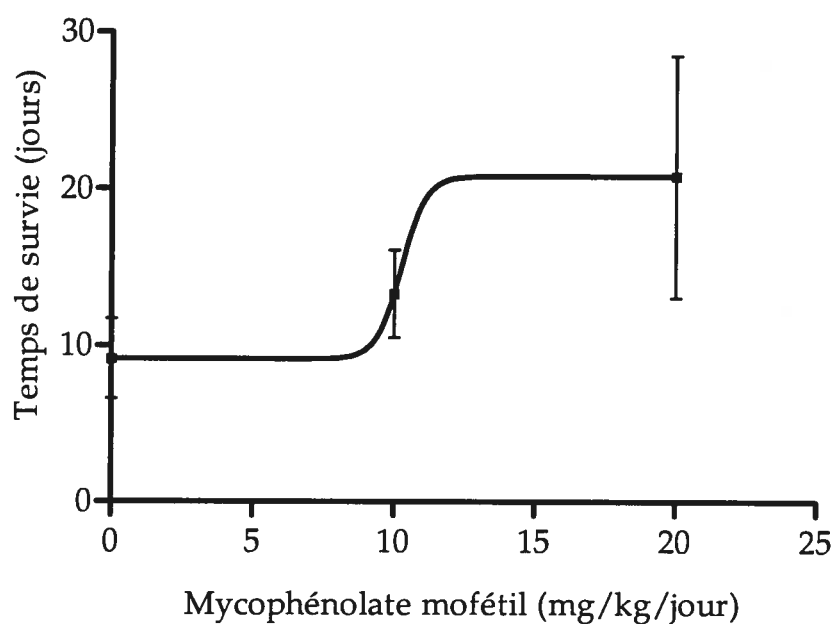


FIGURE 6.1.9. Effet de la combinaison du sirolimus et du mycophénolate mofétil dans la prévention du rejet aigu de l'allogreffe pancréatique chez le rat (BN → LEW)

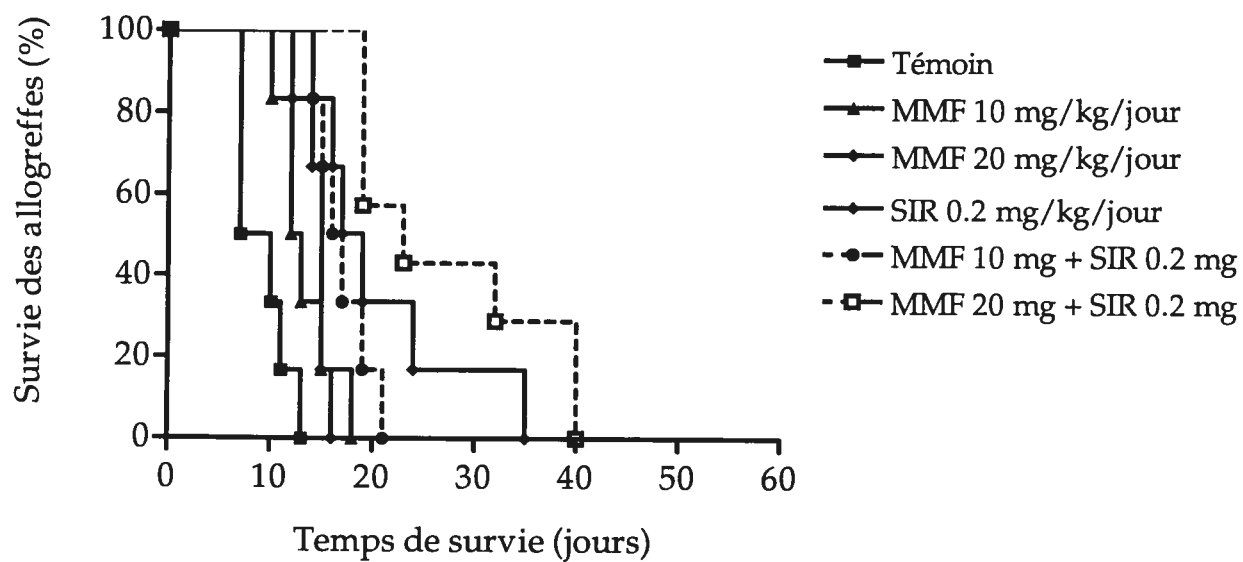


FIGURE 6.1.10. Courbe dose-réponse du sirolimus dans la prévention du rejet aigu de l'allogreffe rénale chez le rat (BUF → WFu)

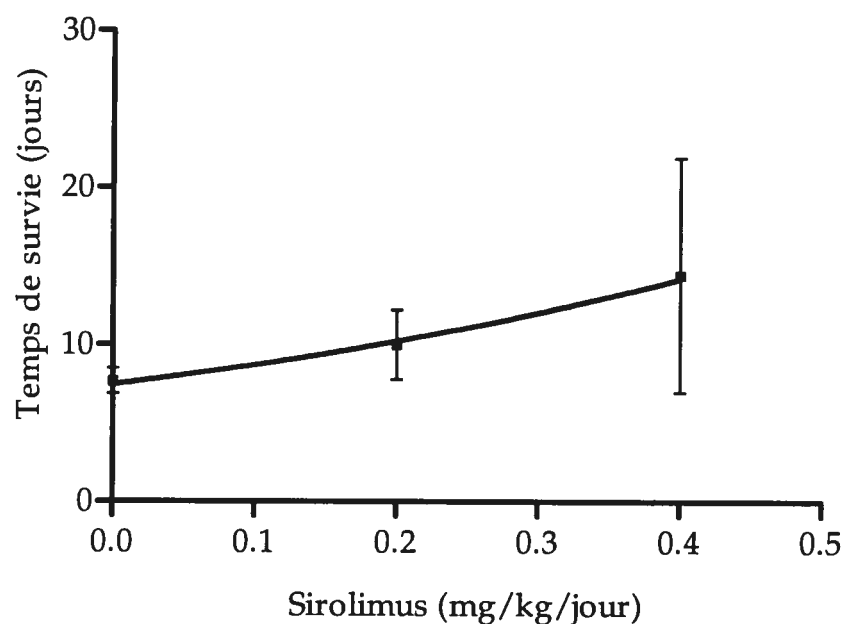


FIGURE 6.1.11. Courbe dose-réponse du mycophénolate mofétil dans la prévention du rejet aigu de l'allogreffe rénale chez le rat (BUF → WFu)

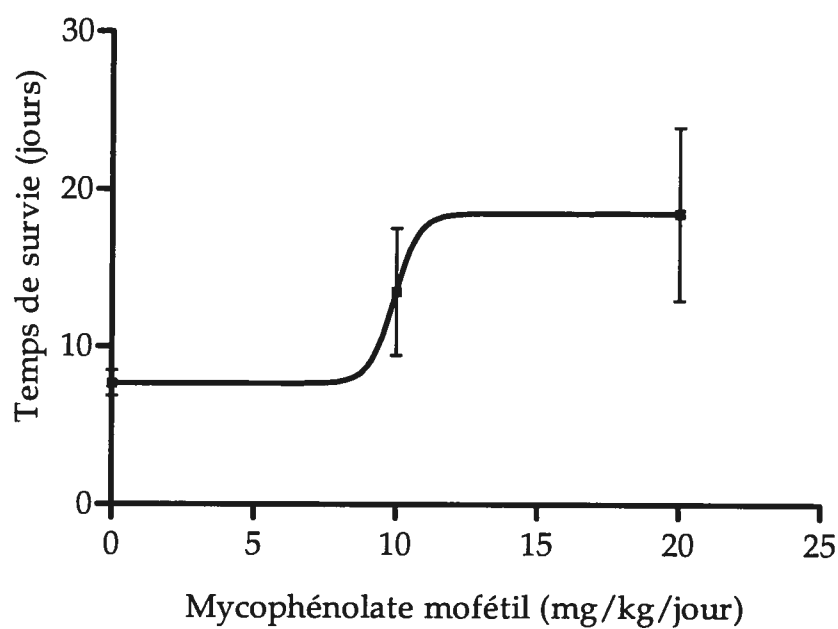
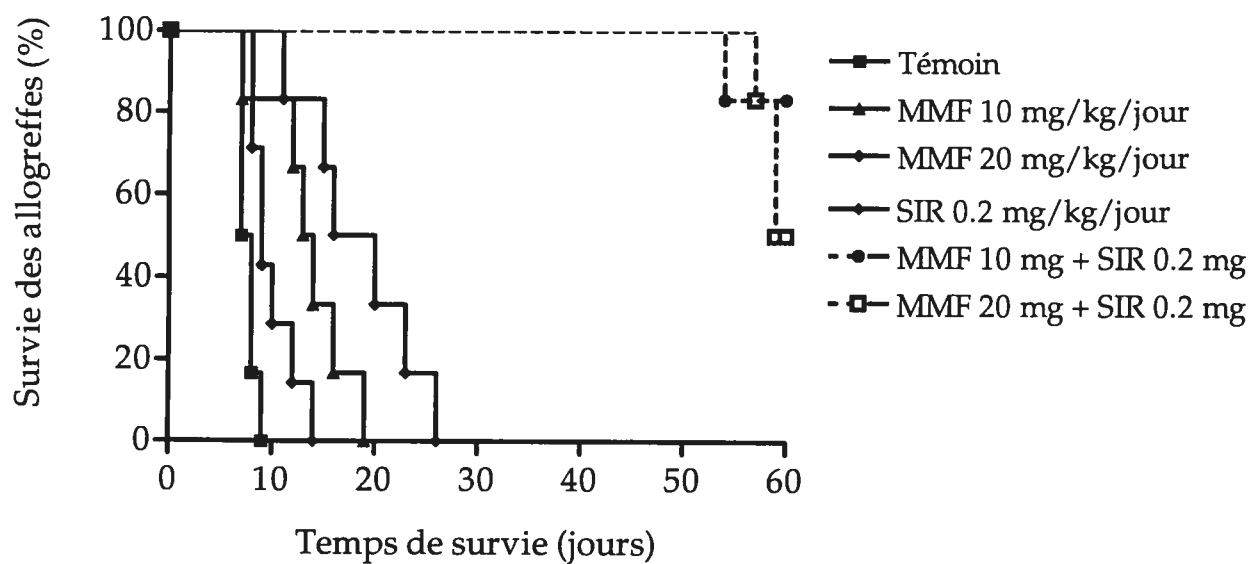


FIGURE 6.1.12. Effet de la combinaison du sirolimus et du mycophénolate mofétil dans la prévention du rejet aigu de l'allogreffe rénale chez le rat (BUF → WFu)



6.2. MANUSCRITS II ET III

Critique de la méthodologie

Test de prolifération. Nous avons évalué la combinaison *in vitro* du FK778 et du tacrolimus à inhiber les lymphocytes T et B, à l'aide du test de prolifération. Toutefois, il est important de préciser que dans notre modèle d'étude, nous avons utilisé une population hétérogène de cellules immunitaires soit des cellules splénocytes de souris, des cellules isolées de ganglions lymphatiques de singe Vervet, ainsi que des cellules mononucléées du sang périphérique humain, et non pas une population homogène de lymphocytes T ou B. Dans cette étude, malgré l'utilisation de mitogènes spécifiques aux lymphocytes T et B, il faut tout de même être prudent dans l'interprétation des résultats puisque le test de prolifération détecte toutes les cellules activées en prolifération, c'est-à-dire celles qui ont incorporé la ^3H -thymidine, sans toutefois discriminer les types cellulaires. En effet, on retrouve un pourcentage différent de lymphocytes T et B dans les organes lymphoïdes secondaires et dans le sang (Abbas et al., 2000). D'un autre côté, l'utilisation d'une population homogène de lymphocytes T ou B dans le test de prolifération n'est pas idéale, puisque l'activation des lymphocytes T requiert le signal 1 (interaction de l'antigène et des corécepteurs), le signal 2 (interaction des cellules présentatrices d'antigènes et des lymphocytes via les molécules de costimulation) et le signal 3 (la prolifération et différenciation cellulaires induites par les cytokines) (Kahan, 2002). Or, l'utilisation de mitogènes ne correspond qu'au signal 1, et la présence de cellules présentatrices d'antigènes (par exemple, les lymphocytes B, les cellules dendritiques et les monocytes) est donc nécessaire. L'utilisation d'une population hétérogène de cellules immunitaires est donc justifiée dans notre modèle expérimental. Toutefois, il serait plus juste d'affirmer que la combinaison du FK778 et du tacrolimus produit 1) des effets synergiques dans l'inhibition de la prolifération des splénocytes murins activés avec LPS, mais des effets antagonistes chez ces splénocytes lorsqu'ils sont activés avec Con A; 2) des effets synergiques dans l'inhibition de la prolifération des cellules de ganglions lymphatiques du singe Vervet activées par SAC + IL-2, mais

des effets antagonistes chez ces cellules isolées lorsqu'elles sont activées avec PHA; 3) et des effets synergiques dans l'inhibition de la prolifération des cellules mononucléées du sang périphérique humain activées avec SAC + IL-2, mais des effets antagonistes chez ces cellules lorsqu'elles sont activées avec PHA. Pour les raisons citées préalablement, nous jugeons acceptable d'affirmer, par convention, que la thérapie combinée du FK778 et du tacrolimus produit des effets synergiques dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes B, mais des effets antagonistes chez les lymphocytes T, puisque les mitogènes utilisés sont spécifiques aux lymphocytes T (Con A et PHA) et aux lymphocytes B (LPS et SAC) (Tableau 1.9.1). Enfin, nous avons vérifié l'effet des véhicules seuls, le DMSO et l'éthanol 100%, sur la prolifération cellulaire. Comme ces véhicules respectifs pour le FK778 et le tacrolimus sont cytotoxiques à une certaine concentration, il est primordial de vérifier que l'effet antiproliférateur observé est vraiment dû à l'agent immunosuppresseur étudié et non pas le véhicule en soit (données non illustrées).

Modèle de l'allogreffe rénale (ACI→LEW) chez le rat. Dans cette étude, nous avons choisi l'allogreffe rénale du rat avec une combinaison d'espèces complètement allogénique ACI (RT1^a) → LEW (RT1^l) comme modèle expérimental, puisque l'efficacité du tacrolimus et du FK778 a déjà été démontrée à prévenir contre le rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez le rat.

Interprétation des résultats

Tel que rapporté dans le troisième chapitre de cette thèse de doctorat, en référence aux manuscrits II et III, nous avons démontré que la thérapie combinée du malononitrilamide FK778 et du tacrolimus i) produit des effets synergiques dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes B, mais elle semble être antagoniste chez les lymphocytes T, chez la souris, le primate non-humain et l'humain; ii) lorsque l'administration du FK778 est retardée au jour 7 posttransplantation, et que le tacrolimus est administré durant la première semaine en monothérapie, cette

combinaison du FK778 et du tacrolimus dite FK778-retardée permet de prolonger de façon significative la survie des allogreffes rénales chez le rat et le primate non-humain, comparativement à la thérapie combinée dite conventionnelle, où FK778 et tacrolimus sont administrés de façon concomitante durant les deux premières semaines posttransplantation.

Résultats *in vitro*. Les figures 6.2.1 et 6.2.2 illustrent des histogrammes représentant l'effet de la thérapie combinée du FK778 et du tacrolimus sur les lymphocytes T et B. Dans la figure 6.2.1, il n'y a pas de doute que la combinaison FK778 et tacrolimus produit des effets synergiques à inhiber la prolifération chez les lymphocytes B. Cependant, lorsqu'on regarde la figure 6.2.2, à première vue, on peut observer que cette combinaison inhibe la prolifération des lymphocytes. Or, nos résultats démontrent plutôt que le FK778 et le tacrolimus produisent des effets antagonistes dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T. Il est à noter qu'il faut faire attention lors de l'analyse de ces résultats exprimés sous forme d'histogramme. Dans ce modèle expérimental, nous utilisons la combinaison de deux agents immunosuppresseurs, dont le tacrolimus qui est reconnu à posséder la propriété d'inhiber l'activation des lymphocytes T. Il est donc probable qu'on voit une certaine inhibition de la prolifération lymphocytaire avec cette association du FK778 et du tacrolimus. Par contre, même si on voit une inhibition de la prolifération lymphocytaire, cela ne veut point dire que l'interaction entre le FK778 et le tacrolimus est synergique. Elle peut très bien être antagoniste et démontrer quand même une inhibition lymphocytaire modérée. Par exemple, dans le panneau A de la figure 6.2.2., on peut remarquer qu'une combinaison de FK778 7.5 μ M + TAC 0.156 nM (groupe 12) produit une inhibition lymphocytaire de 50.6%. Or, selon le principe de l'effet médian et l'index de combinaison, l'interaction entre le FK778 et le tacrolimus est antagoniste (CI=6.096), puisqu'une monothérapie au tacrolimus cause déjà une inhibition de la prolifération des lymphocytes T de souris de près de 50% (Figure 6.2.3). Toutes les expériences chez

chaque espèce sont répétées au moins trois fois, et les résultats présentés proviennent d'expériences représentatives.

En outre, nous avons rapporté que la sensibilité des lymphocytes T et B semble être spécifique à l'espèce: souris > primate non-humain \geq humain. Pour ce faire, nous avons comparé la ED50 (dose associée à un effet de 50%) de la courbe dose-réponse du FK778 sur les lymphocytes T ou B de chaque espèce. Chez les lymphocytes T, la ED50 du FK778 chez la souris, le primate non-humain et l'humain est de 17.7 μ M, 31.7 μ M et 68.4 μ M, respectivement. Tandis que chez les lymphocytes B, la ED50 du FK778 chez la souris, le primate non-humain et l'humain est de 24.8 μ M, 57.1 μ M et 60.0 μ M, respectivement (Figure 6.2.4). Nos résultats sont en cohérence avec ceux de Gregory et al. (1998), où les auteurs rapportent également qu'il existe une spécificité à l'espèce quant à la sensibilité des lymphocytes aux malononitrilamides. De manière intéressante, il a été rapporté dans la littérature que les agents isoxazol et les dérivés de l'acide cinchoninique (par exemple, le leflunomide) inhibent l'enzyme DHODH de manière spécifique à l'espèce (Knecht et al., 1998). Ceci suggère que les effets antiproliférateurs du FK778 implique fortement l'inhibition de la biosynthèse des pyrimidines via le blocage de l'enzyme DHODH. Cependant, il a été rapporté que l'addition d'uridine exogène a peu d'effet sur l'activité immunosuppressive du leflunomide dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat (Chong et al., 1999). Ceci ne fait que renforcer l'affirmation que le mécanisme d'action du leflunomide et des malononitrilamides est complexe, voire même qui pourrait impliquer plus de deux voies biochimiques.

Résultats *in vivo*. Dans un second temps, nous avons évalué l'effet *in vivo* de la thérapie combinée du FK778 et du tacrolimus dans un modèle de transplantation rénale chez le rat. Tel que souligné dans la discussion du manuscrit II, nous avons avancé comme hypothèse qu'il y aurait avantage à éviter l'utilisation concomitante du FK778 et du tacrolimus durant les premiers jours suite à la transplantation d'allogreffe puisque cette période critique du rejet allogénique implique principalement la participation des

lymphocytes T, et plutôt à retarder l'administration du FK778 au jour 7 posttransplantation. Comme nos résultats *in vitro* démontrent que la combinaison du FK778 et du tacrolimus n'est point efficace à inhiber les lymphocytes T, nous croyons qu'il est préférable d'éviter cette combinaison durant la première semaine posttransplantation aux risques d'aggraver le rejet aigu d'allogreffe. Durant les premiers jours, une monothérapie au tacrolimus serait plus efficace pour prévenir contre la réponse allogénique. Néanmoins, puisque la combinaison du FK778 et du tacrolimus permet d'inhiber efficacement la prolifération des lymphocytes B, nous croyons qu'une telle combinaison serait efficace dans la prévention contre le rejet aigu d'allogreffe, via l'inhibition des lymphocytes B, puisque de nombreuses études rapportent l'importance de la réponse humorale dans le rejet d'organe (Baid et al., 2001; Mahoney et al., 2002; Orosz et al., 2000). Le rejet aigu est divisé en deux phases: la phase précoce et la phase centrale. Dans la phase précoce, qui survient suite à la rencontre des cellules présentatrices d'antigènes avec les alloantigènes, les lymphocytes T deviennent activés et commencent à proliférer. À ce moment, ils représentent les principaux leucocytes responsables du rejet de greffe. Dans la phase centrale, lorsque les lymphocytes T activés infiltrent l'allogreffe, ils sécrètent des cytokines et des chimiokines (signal 3) qui vont recruter d'autres cellules immunitaires, par exemple les lymphocytes B, à participer au processus de rejet. En retardant le traitement de FK778 dans la thérapie combinée, on évite les effets antagonistes sur les lymphocytes T lors de la phase précoce, et on peut toujours bénéficier des effets synergiques chez les lymphocytes B durant la phase centrale (Burmester et al., 2000). En effet, tel qu'illustré à la figure 6.2.5., lorsque nous retardons l'administration du FK778 (10 mg/kg/jour) au jour 7 posttransplantation, mais que le tacrolimus (1 mg/kg/jour) est administré dès le jour de transplantation, la survie des allogreffes est significativement prolongée à 74.9 ± 14.9 jours, voire de manière très synergique ($CI < 0.001$), comparativement au groupe de combinaison conventionnelle où les rats receveurs sont traités de façon concomitante au FK778 et au tacrolimus (25.5 ± 5.9 jours; $P < 0.001$). Dans une même ordre d'idée, nous avons évalué un groupe de combinaison où nous prétraitons les rats receveurs au

FK778, 7 jours avant la transplantation (du jour -7 au jour -1), pour ensuite continuer le traitement immunosuppresseur avec le tacrolimus seul, pendant 14 jours posttransplantation (du jour 1 au jour 14). Même si la survie des allogreffes prétraitées au FK778 est prolongée à 45.1 ± 34.7 jours ($n=10$), il existe une très grande variation interindividuelle, et un simple test statistique démontre que cette prolongation de survie n'est pas significative lorsque comparée avec l'effet de la thérapie combinée conventionnelle (25.5 ± 5.9 jours; $P=0.197$). Néanmoins, on peut quand même remarquer que le fait d'éviter l'utilisation concomitante du FK778 et du tacrolimus durant la première semaine posttransplantation soit bénéfique à prévenir contre le rejet d'allogreffe. Toutefois, un point important à souligner est que la thérapie combinée du FK778 et du tacrolimus, même administrée de manière concomitante, n'est point néfaste pour prévenir contre le rejet aigu. Effectivement, nos résultats démontrent qu'une thérapie combinée conventionnelle de FK778 et de tacrolimus prolonge quand même de manière significative la survie des allogreffes rénales à 25.5 ± 5.9 jours, lorsque comparée aux groupes de monothérapie au FK778 (16.8 ± 3.1 jours; $P<0.05$) et au tacrolimus (10.5 ± 1.4 jours; $P<0.05$). En outre, notre groupe a récemment rapporté que la combinaison du FK778 et du tacrolimus administrée de manière conventionnelle permet de prolonger la survie d'allogreffe dans un modèle de transplantation cardiaque chez le rat (Bilolo et al., 2003). La figure 6.2.6 illustre les différents protocoles d'administration du FK778 et du tacrolimus en thérapie combinée.

Expériences additionnelles

Évaluation histologique des allogreffes rénales traitées avec la thérapie combinée FK778-retardée. En outre, nous avons effectué une histopathologie générale à l'éosine/hématoxyline des allogreffes rénales des receveurs traités avec la thérapie combinée FK778-retardée, dont la survie est prolongée (>60 jours). Après avoir euthanasié les rats receveurs avec une surdose d'anesthésique, les allogreffes sont récoltées et conservées dans une solution de formalin jusqu'au moment de la préparation des coupes histologiques. Le sang est également recueilli dans des tubes

contenant de l'héparine pour fins d'analyses biochimiques. Après analyses sanguines, toutes les allogreffes démontraient une fonction rénale stable avec un taux de créatinine plasmatique inférieur à 103 mmol/L (taux normaux de créatinine = 38—115 mmol/L). Les coupes histologiques sont préparées selon une méthode conventionnelle et elles sont traitées à l'éosine/hématoxyline afin d'évaluer la morphologie macroscopique des allogreffes. La figure 6.2.7 démontre les coupes histologiques (20X) à l'éosine/hématoxyline A) d'un rein normal; B) d'une isogreffe rénale; C) d'une allogreffe non-traitée; et D-I) des allogreffes, avec survie prolongée, de receveurs traités avec la thérapie combinée FK778-retardée. De façon générale, les allogreffes traitées avec la thérapie combinée FK778-retardée ne démontrent pas ou très peu de signes apparents de rejet aigu (Figure 6.2.7D-I). Les signes typiques d'un rejet aigu d'allogreffe rénale sont une sévère infiltration diffuse de cellules mononucléaires, une oblitération extensive des tubules, une présence de nécrose et d'hémorragie, et une perte ou un endommagement des glomérules (Thiru et al., 2000). Les allogreffes #18 (Figure 6.2.7D) et #19 (Figure 6.2.7E), sacrifiées au jour 98, démontrent une morphologie rénale quasi normale. Malgré la présence d'une faible infiltration cellulaire, il n'y a pas de signe apparent de rejet aigu. Par contre, on peut remarquer la présence d'espaces interstitielles entre les tubules, signe précoce d'un rejet chronique. La figure 6.2.7F représente l'allogreffe #23, sacrifiée au jour 68: on peut remarquer la présence d'une sévère infiltration cellulaire diffuse. Néanmoins, les tubules et glomérules semblent normaux, et aucun signe de rejet aigu sévère n'est observé. On peut également voir la présence d'un épaississement d'un vaisseau sanguin, signe d'un début de rejet chronique. La figure 6.2.7G représente l'allogreffe #24, sacrifiée au jour 68: on peut observer une sévère infiltration cellulaire diffuse et une faible oblitération extensive des tubules. Par contre, les glomérules sont quasi normaux. Aucun signe apparent de rejet aigu n'est observé. En outre, on peut voir l'épaississement d'un vaisseau sanguin, signe précoce d'un rejet chronique. La figure 6.2.7H démontre l'allogreffe #26, sacrifiée au jour 67: on peut remarquer une infiltration cellulaire diffuse modérée, en présence de glomérules normaux. Il n'y a aucun signe proéminent de rejet aigu. Par contre, la

présence d'une fibrose modérée et d'espaces interstitielles tubulaires suggère un rejet chronique précoce. La figure 6.2.7I représente l'allogreffe #28, sacrifiée au jour 66: on peut remarquer que la morphologie rénale est quasi normale, avec très peu d'infiltration cellulaire localisée. Il est à noter que malgré les degrés variés d'endommagement morphologique des différentes allogreffes, outre la présence d'infiltration des cellules mononucléaires, aucun autre signe apparent de rejet aigu n'est observé, et toutes ces allogreffes possédaient une fonction rénale normale au moment du sacrifice.

Évaluation comparative des groupes de combinaison: histopathologie et fonction rénale. Une expérience supplémentaire que nous avons effectuée consiste à évaluer et comparer l'histologie générale à l'éosine/hématoxyline et la fonction des allogreffes rénales de rats receveurs traités avec la thérapie combinée conventionnelle du FK778 et du tacrolimus *versus* la thérapie combinée FK778-retardée, au jour 21 posttransplantation. Pour ce faire, nous avons effectué la transplantation rénale ACI→LEW (n=2-3/groupe), et réparti les receveurs en quatre groupes: 1) témoin non-traité; 2) isogreffe non-traitée; 3) combinaison conventionnelle; 4) combinaison FK778-retardée. Au 21^e jour posttransplantation, nous avons sacrifié les rats receveurs des groupes 2, 3 et 4, à l'aide d'une surdose d'anesthésique, et récolté les allogreffes rénales qui sont ensuite conservées dans une solution de formaline jusqu'au moment de la préparation des coupes histologiques. Le sang complet est également récolté pour fins d'analyses biochimiques. Les tests biochimiques sanguins démontrent que tous les receveurs des groupes 2, 3 et 4 possèdent une fonction rénale normale à 21 jours posttransplantation, avec des taux de créatinine plasmatique se situant entre 34 mmol/L et 122 mmol/L. Les receveurs du groupe témoin non-traité sont sacrifiés au jour 6 posttransplantation, et leur taux de créatinine plasmatique se situaient entre 505 mmol/L et 629 mmol/L, signe de rejet de l'allogreffe rénale. Nous avons ensuite évalué les coupes histologiques des allogreffes des différents groupes, et comparer le groupe de combinaison FK778-retardée *versus* le groupe de combinaison conventionnelle. La figure 6.2.8 illustre une

histologie représentative des deux groupes. Les coupes histologiques à l'éosine/hématoxyline démontrent que l'allogreffe rénale traitée avec une combinaison conventionnelle de FK778 et de tacrolimus (A) représente moins d'infiltration cellulaire que l'allogreffe traitée avec la combinaison FK778-retardée (B), à 21 jours posttransplantation. Chez l'allogreffe traitée avec une combinaison conventionnelle de FK778 et de tacrolimus (A), on peut observer une infiltration cellulaire diffuse, faible à modérée, tandis que chez l'allogreffe traitée avec la combinaison FK778-retardée (B), cette infiltration cellulaire diffuse est modérée à sévère. Les glomérules et tubules sont normaux dans les deux groupes. Cependant, il est important de souligner que la fonction rénale des allogreffes était normale au moment du sacrifice, à 21 jours posttransplantation. Il est bien connu que l'infiltration cellulaire observée dans le rejet aigu d'allogreffe consiste en l'envahissement de cellules mononucléaires, débutant quelques heures seulement après la transplantation et devenant évidente après quelques jours. Ces cellules mononucléaires représentent une hétérogénéité morphologique, et elles consistent en des lymphocytes de petite et de grande taille, des immunoblastes, des macrophages, des éosinophiles et des plasmocytes (Thiru et al., 2000). En clinique, les biopsies d'allogreffes rénales sont considérées comme étant la méthode de choix pour diagnostiquer le rejet aigu. Le diagnostic du rejet aigu consiste à identifier la présence d'une infiltration de cellules mononucléaires au moment de la dysfonction de l'allogreffe. Cependant, l'exactitude de cette méthode a été remise en question puisqu'il a été observé chez des allogreffes de patients avec une fonction rénale stable, la présence d'une infiltration localisée ou faiblement diffuse de cellules mononucléaires (Rush et al., 1994). En outre, il a été suggéré que ces cellules infiltrantes puissent ne pas être cytopathiques envers l'allogreffe voire même protectrices (Akalın et al., 2001). Il serait alors intéressant d'évaluer l'expression des gènes dans des biopsies d'allogreffes rénales utilisant une technologie d'avant-garde (par exemple, le *DNA chip*), afin d'identifier la nature fonctionnelle de ces cellules infiltrantes, et de déterminer leur signification clinique, avant que tout traitement hasardeux ne soit appliqué.

FIGURE 6.2.1. Effets synergiques de la thérapie combinée du FK778 et du tacrolimus dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes B activés chez A) la souris, B) le primate non humain, et C) l'humain

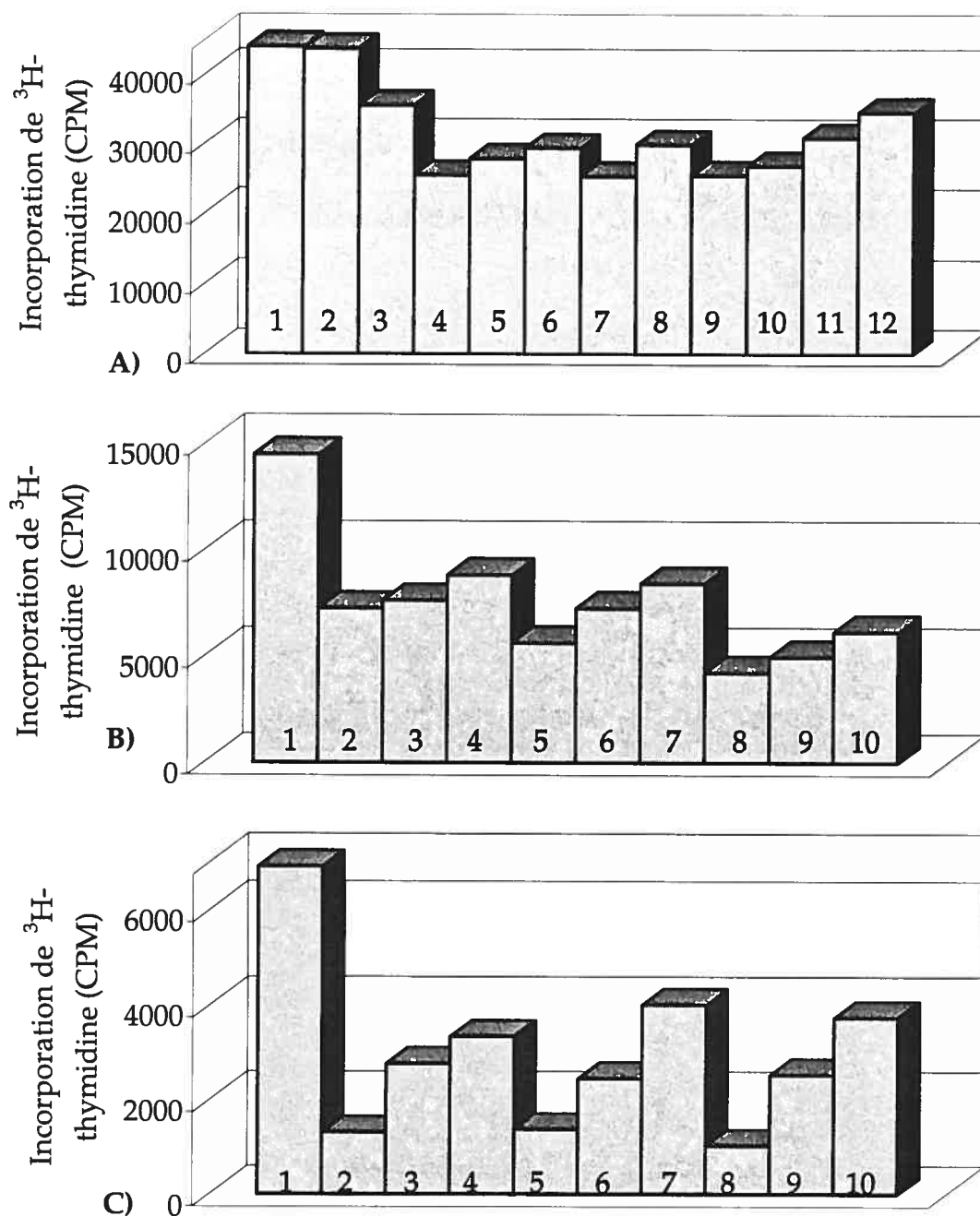


FIGURE 6.2.1. (Légende) Effets synergiques de la thérapie combinée du FK778 et du tacrolimus dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes B activés chez A) la souris, B) le primate non-humain, et C) l'humain. TAC et FK778 sont respectivement dissous dans l'éthanol et le DMSO, à des concentrations non toxiques. A) Les splénocytes de souris sont stimulés avec LPS. Groupes: 1) LPS, 2) FK778 11.1 μM + TAC 0.048 nM, 3) FK778 1.23 μM + TAC 0.048 nM, 4) FK778 11.1 μM + TAC 0.024 nM, 5) FK778 3.7 μM + TAC 0.024, 6) FK778 1.23 μM + TAC 0.024 nM, 7) FK778 11.1 μM + TAC 1.2 nM, 8) FK778 3.7 μM + TAC 1.2 nM, 9) FK778 1.23 μM + TAC 1.2 nM, 10) FK778 11.1 μM + TAC 6 nM, 11) FK778 3.7 μM + TAC 6 nM, 12) FK778 1.23 μM + TAC 6 nM. B) Les cellules ganglionnaires de primate non humain sont stimulées avec SAC + IL-2. Groupes: 1) SAC + IL-2, 2) FK778 50 μM + TAC 0.375 μM , 3) FK778 25 μM + TAC 0.375 μM , 4) FK778 12.5 μM + TAC 0.375 μM , 5) FK778 50 μM + TAC 0.75 μM , 6) FK778 25 μM + TAC 0.75 μM , 7) FK778 12.5 μM + TAC 0.75 μM , 8) FK778 50 μM + TAC 1.5 μM , 9) FK778 25 μM + TAC 1.5 μM , 10) FK778 12.5 μM + TAC 1.5 μM . C) Les cellules mononucléées du sang périphérique humain sont stimulées avec SAC + IL-2. Groupes: 1) SAC + IL-2, 2) FK778 50 μM + TAC 0.375 μM , 3) FK778 25 μM + TAC 0.375 μM , 4) FK778 12.5 μM + TAC 0.375 μM , 5) FK778 50 μM + TAC 0.75 μM , 6) FK778 25 μM + TAC 0.75 μM , 7) FK778 12.5 μM + TAC 0.75 μM , 8) FK778 50 μM + TAC 1.5 μM , 9) FK778 25 μM + TAC 1.5 μM , 10) FK778 12.5 μM + TAC 1.5 μM .

FIGURE 6.2.2. Effets antagonistes de la thérapie combinée du FK778 et du tacrolimus dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T activés chez A) la souris, B) le primate non-humain, et C) l'humain

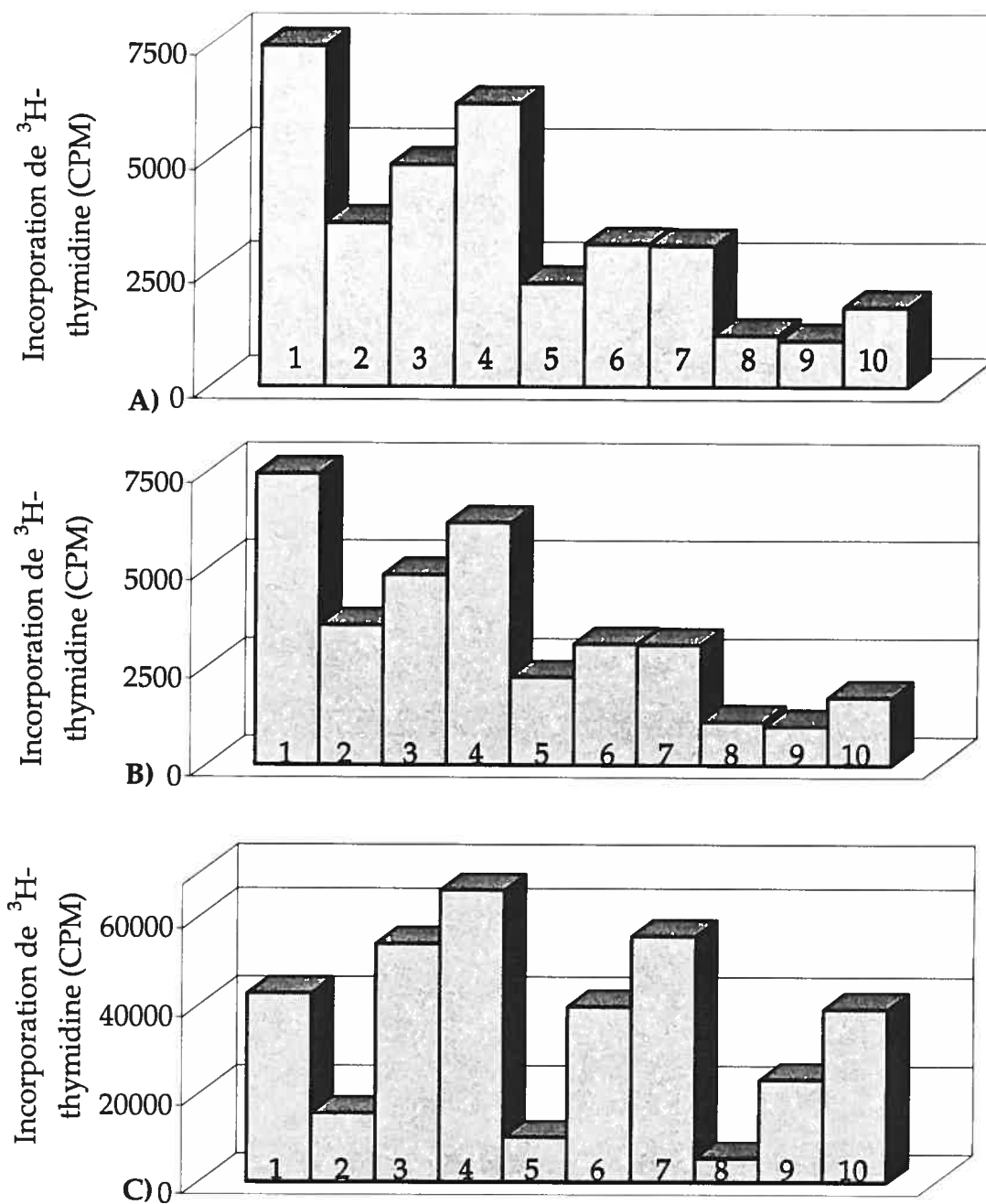


FIGURE 6.2.2. (Légende) Effets antagonistes de la thérapie combinée du FK778 et du tacrolimus dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T activés chez A) la souris, B) le primate non-humain, et C) l'humain. TAC et FK778 sont respectivement dissous dans l'éthanol et le DMSO, à des concentrations non toxiques. A) Les splénocytes de souris sont stimulés avec CON A. Groupes: 1) CON A, 2) FK778 15 μ M + TAC 0.019 nM, 3) FK778 10 μ M + TAC 0.019 nM, 4) FK778 15 μ M + TAC 0.039 nM, 5) FK778 10 μ M + TAC 0.039 nM, 6) FK778 7.5 μ M + TAC 0.039 nM, 7) FK778 15 μ M + TAC 0.078 nM, 8) FK778 10 μ M + TAC 0.078 nM, 9) FK778 7.5 μ M + TAC 0.078 nM, 10) FK778 15 μ M + TAC 0.156 nM, 11) FK778 10 μ M + TAC 0.156 nM, 12) FK778 7.5 μ M + TAC 0.156 nM. B) Les cellules ganglionnaires de primate non-humain sont stimulées avec toxiques Groupes: 1) PHA, 2) FK778 20 μ M + TAC 0.1875 nM, 3) FK778 10 μ M + TAC 0.1875 nM, 4) FK778 5 μ M + TAC 0.1875 nM, 5) FK778 20 μ M + TAC 0.375 nM, 6) FK778 10 μ M + TAC 0.375 nM, 7) FK778 5 μ M + TAC 0.375 nM, 8) FK778 20 μ M + TAC 0.75 nM, 9) FK778 10 μ M + TAC 0.75 nM, 10) FK778 5 μ M + TAC 0.75 nM. C)) Les cellules mononucléées du sang périphérique humain sont stimulées avec toxiques Groupes: 1) PHA, 2) FK778 100 μ M + TAC 0.09375 nM, 3) FK778 50 μ M + TAC 0.09375 nM, 4) FK778 25 μ M + TAC 0.09375 nM, 5) FK778 100 μ M + TAC 0.1875 nM, 6) FK778 50 μ M + TAC 0.1875 nM, 7) FK778 25 μ M + TAC 0.1875 nM, 8) FK778 100 μ M + TAC 0.375 nM, 9) FK778 50 μ M + TAC 0.375 nM, 10) FK778 25 μ M + TAC 0.375 nM.

FIGURE 6.2.3. Courbe dose-réponse du tacrolimus dans l'inhibition de la prolifération des A) lymphocytes T et B) lymphocytes B, chez la souris, le primate non-humain et l'humain

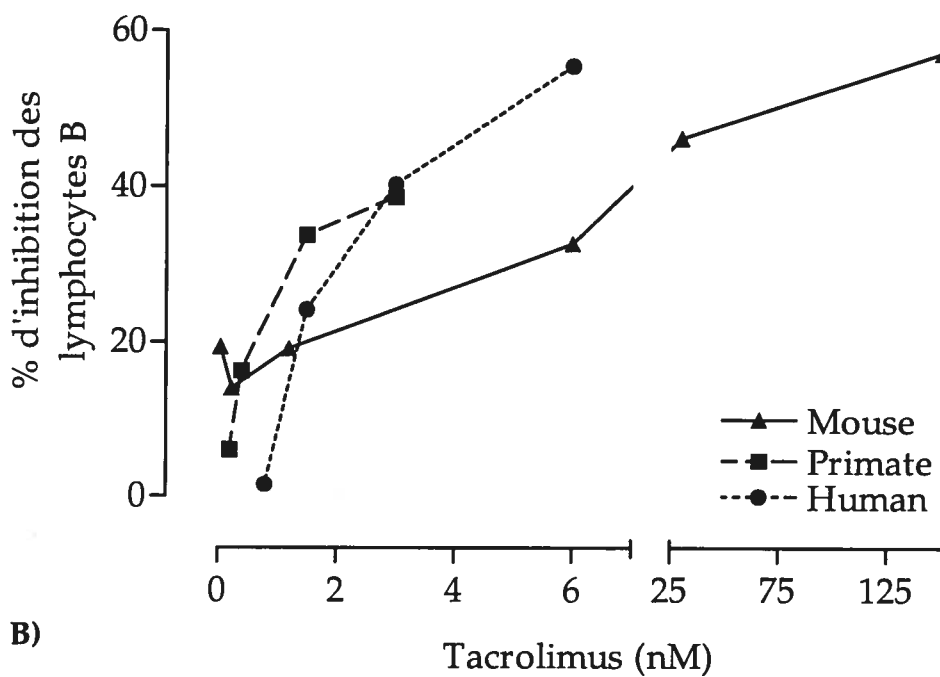
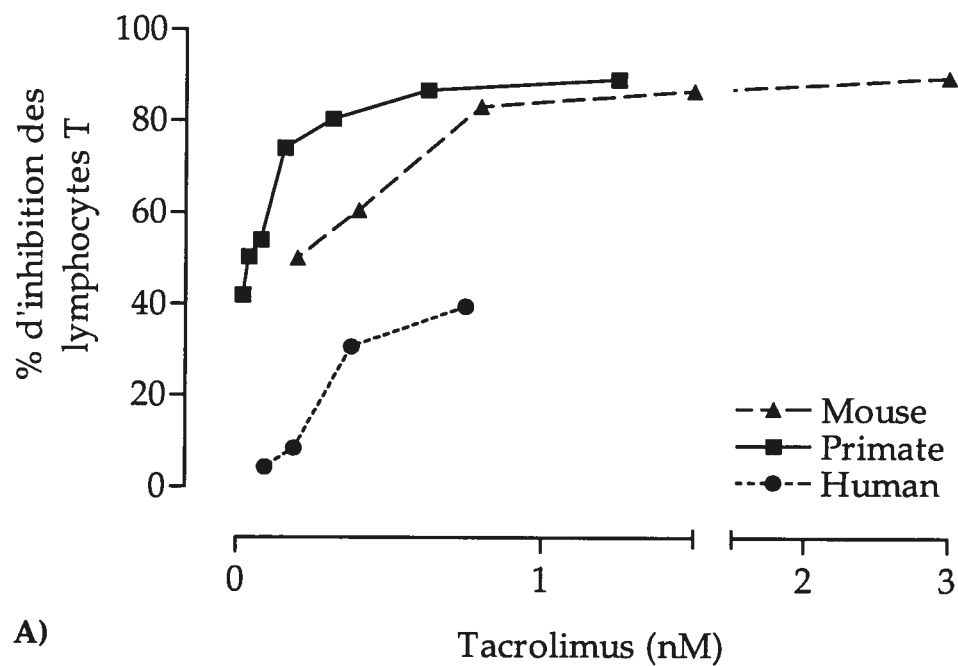


FIGURE 6.2.4. La sensibilité des A) lymphocytes T et B) lymphocytes B au FK778 est spécifique à l'espèce : souris > primate non-humain \geq humain

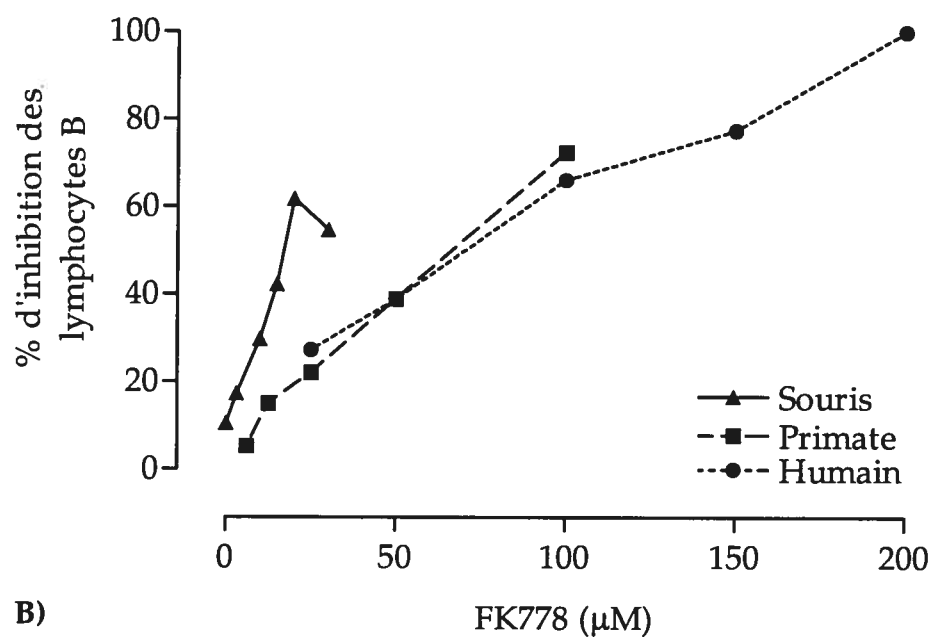
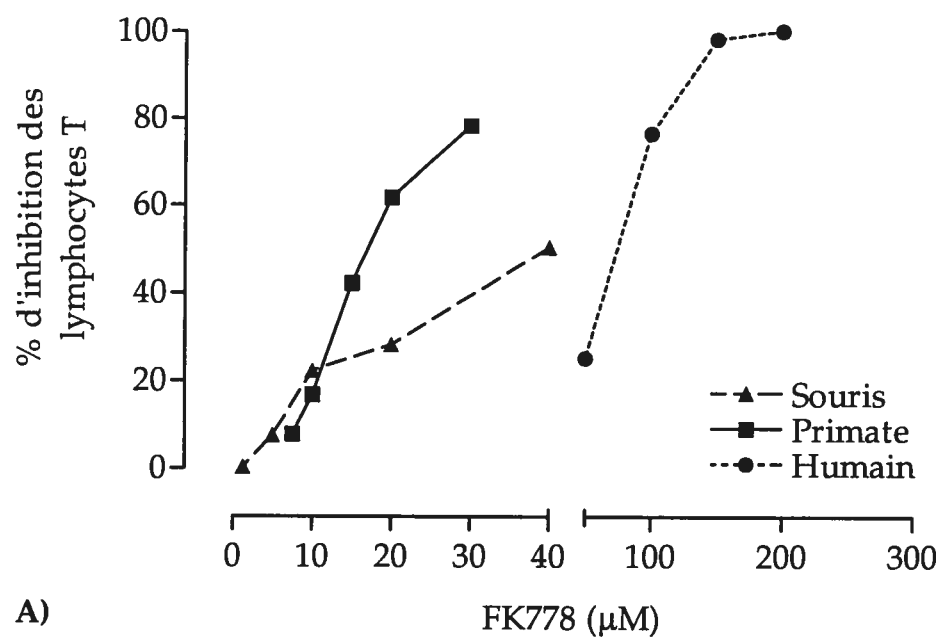


FIGURE 6.2.5. La thérapie combinée du FK778 et du tacrolimus dans la prévention du rejet d'allogreffe rénale chez le rat: comparaison de différentes combinaisons

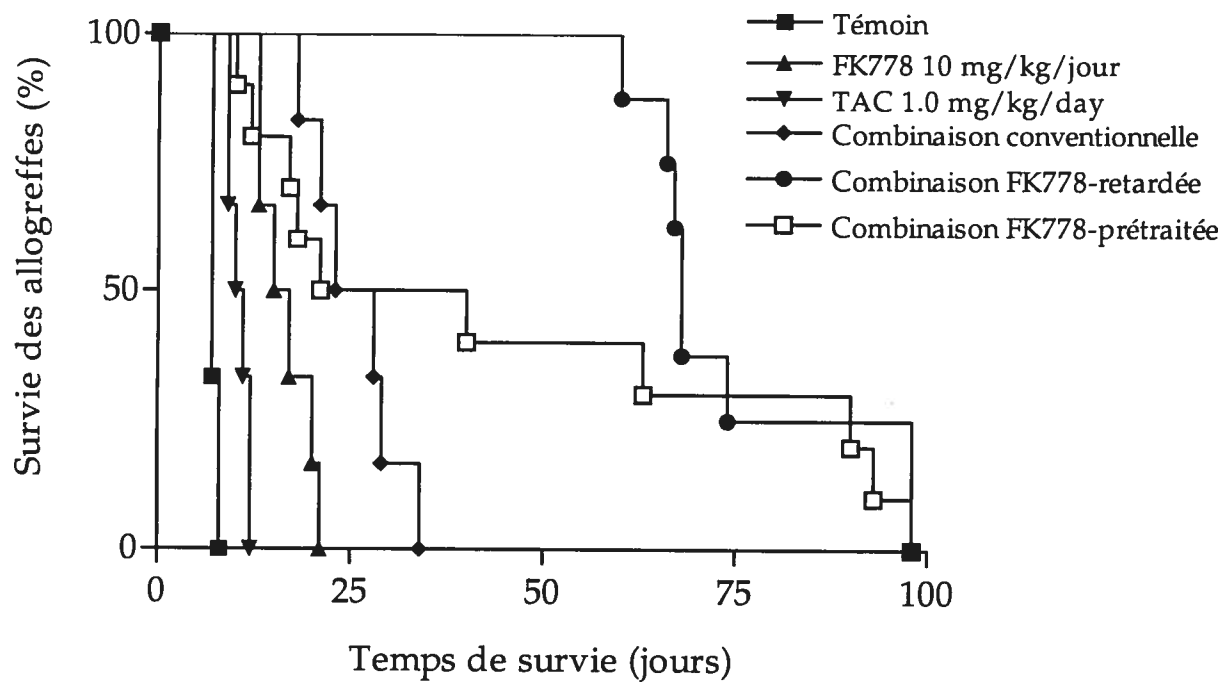


FIGURE 6.2.6. Comparaison des différents protocoles d'administration de la combinaison du FK778 et du tacrolimus: A) conventionnelle, B) FK778-prétraitée, et C) FK778-retardée

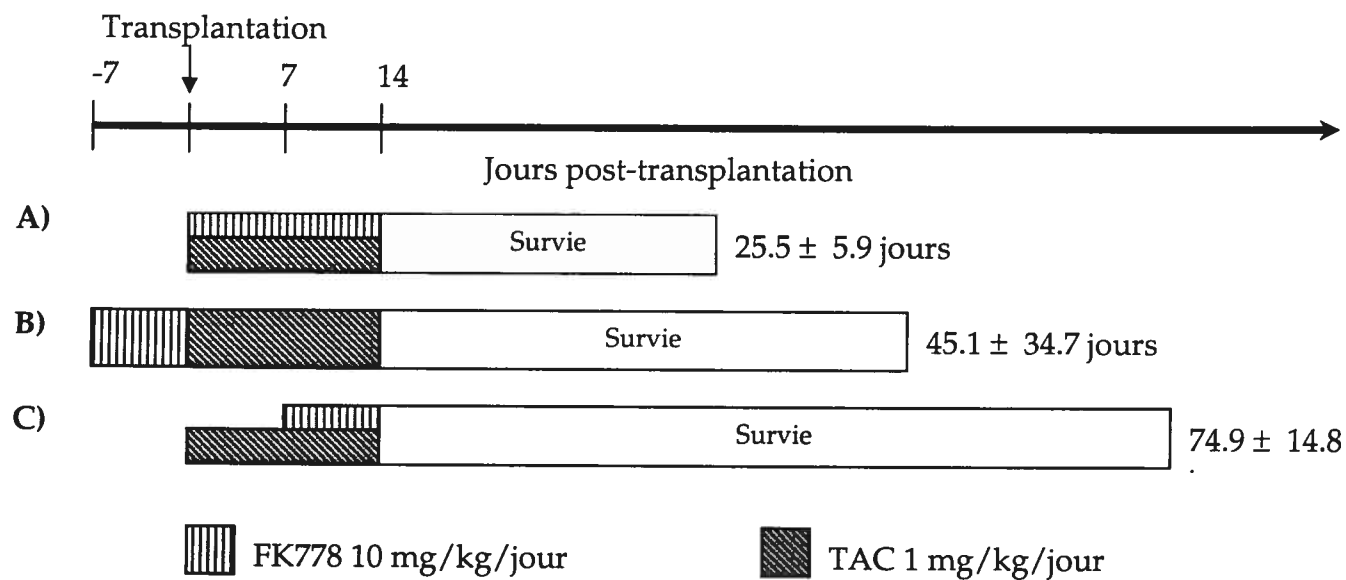
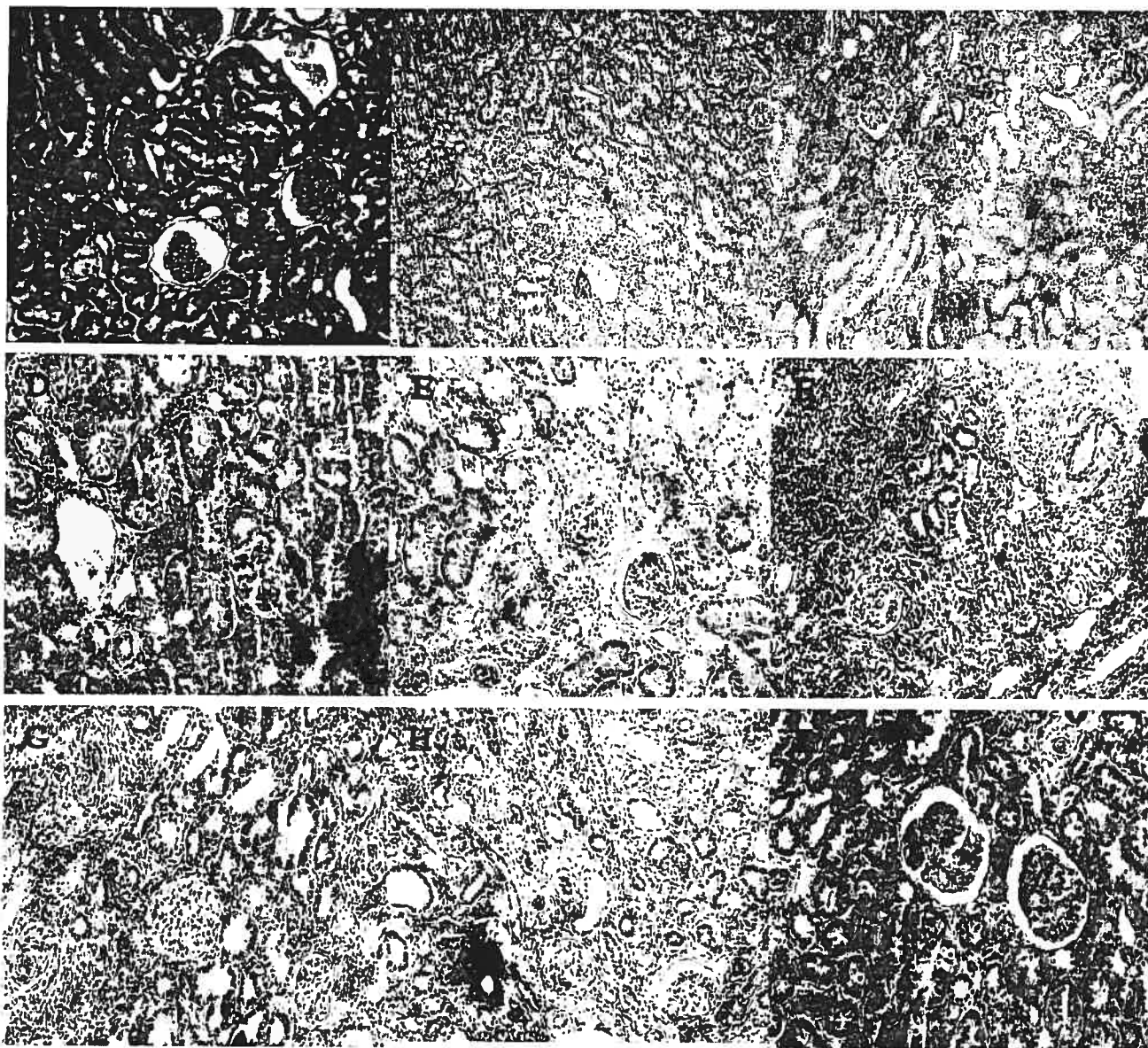
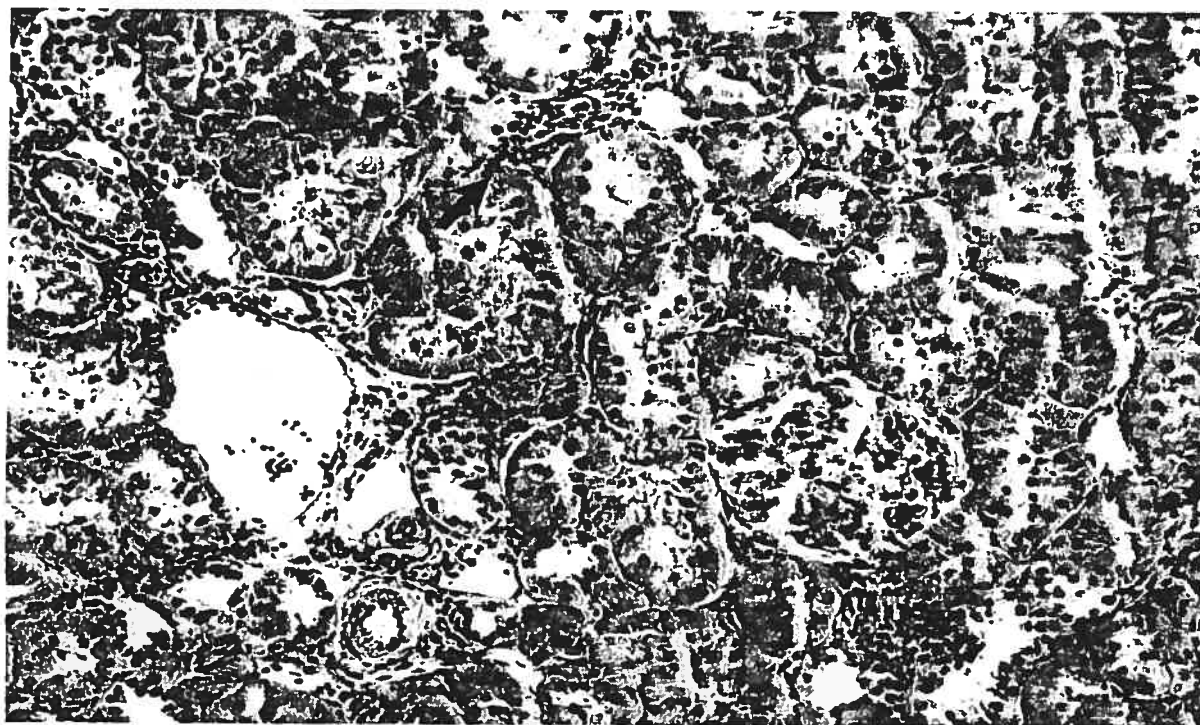


FIGURE 6.2.7. Histopathologie à l'éosine/hématoxyline des allogreffes rénales traitées avec la thérapie combinée FK778-retardée



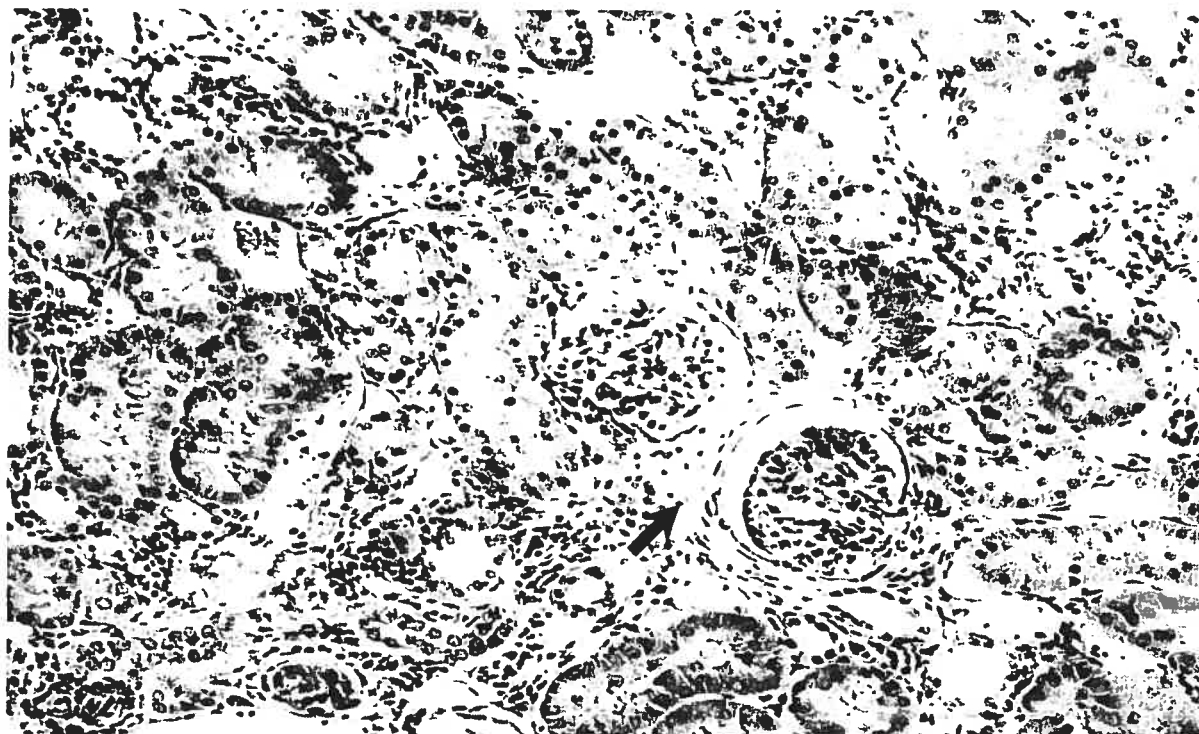
A) Rein normal; B) Isogreffe rénale; C) Allogreffe non traitée; D–I) Allogreffes traitées avec la thérapie combinée FK778-retardée: D) #18 (jour 98); E) #19 (jour 98); F) #23 (jour 68); G) #24 (jour 68); H) #26 (jour 67); I) #28 (jour 68). 20X.

FIGURE 6.2.7D. Histopathologie à l'éosine/hématoxyline de l'allogreffe rénale #18 traitée avec la thérapie combinée FK778-retardée



L'allogreffe #18 sacrifiée au jour 98 démontre une morphologie rénale quasi normale. Malgré la présence d'une faible infiltration cellulaire, il n'y a pas de signe apparent de rejet aigu. Par contre, on peut remarquer la présence d'espaces interstitiels entre les tubules (↗), signe précoce d'un rejet chronique.

FIGURE 6.2.7E. Histopathologie à l'éosine/hématoxyline de l'allogreffe rénale #19 traitée avec la thérapie combinée FK778-retardée



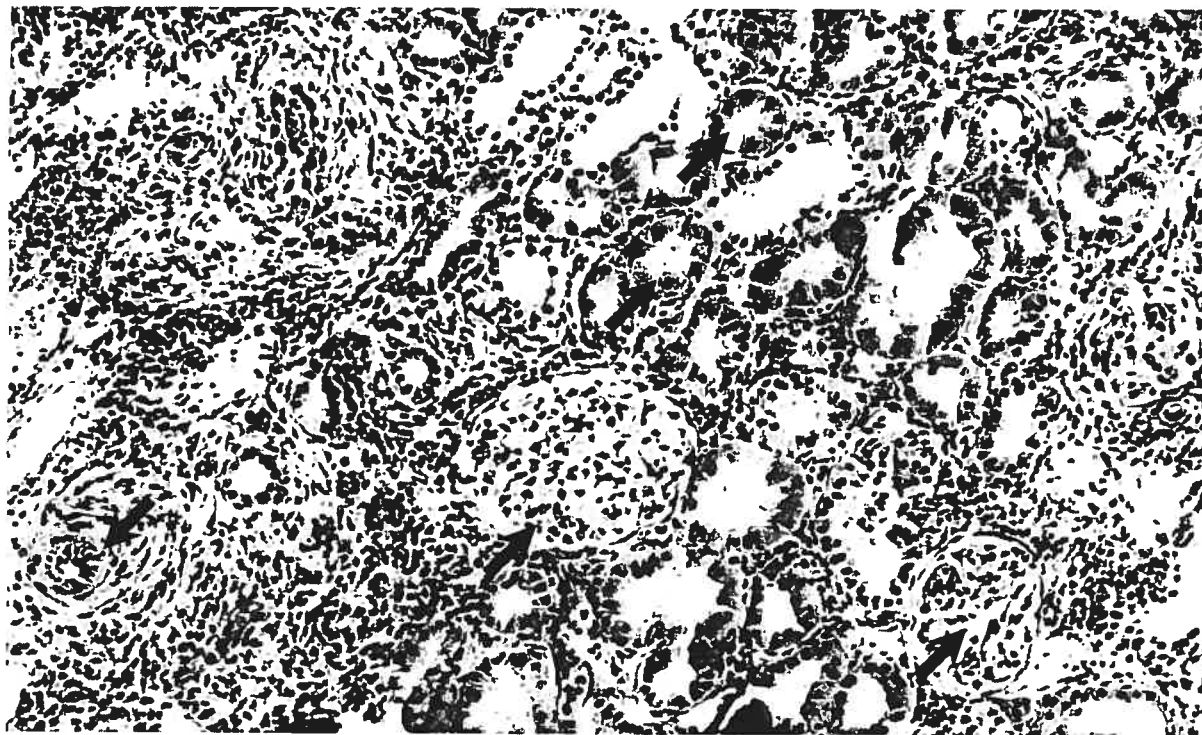
L'allogreffe #19 sacrifiée au jour 98 démontre une morphologie rénale quasi normale. Malgré la présence d'une faible infiltration cellulaire, il n'y a pas de signe apparent de rejet aigu. Par contre, on peut remarquer la présence d'espaces interstitiels entre les tubules (↗), signe précoce d'un rejet chronique.

FIGURE 6.2.7F. Histopathologie à l'éosine/hématoxyline de l'allogreffe rénale #23 traitée avec la thérapie combinée FK778-retardée



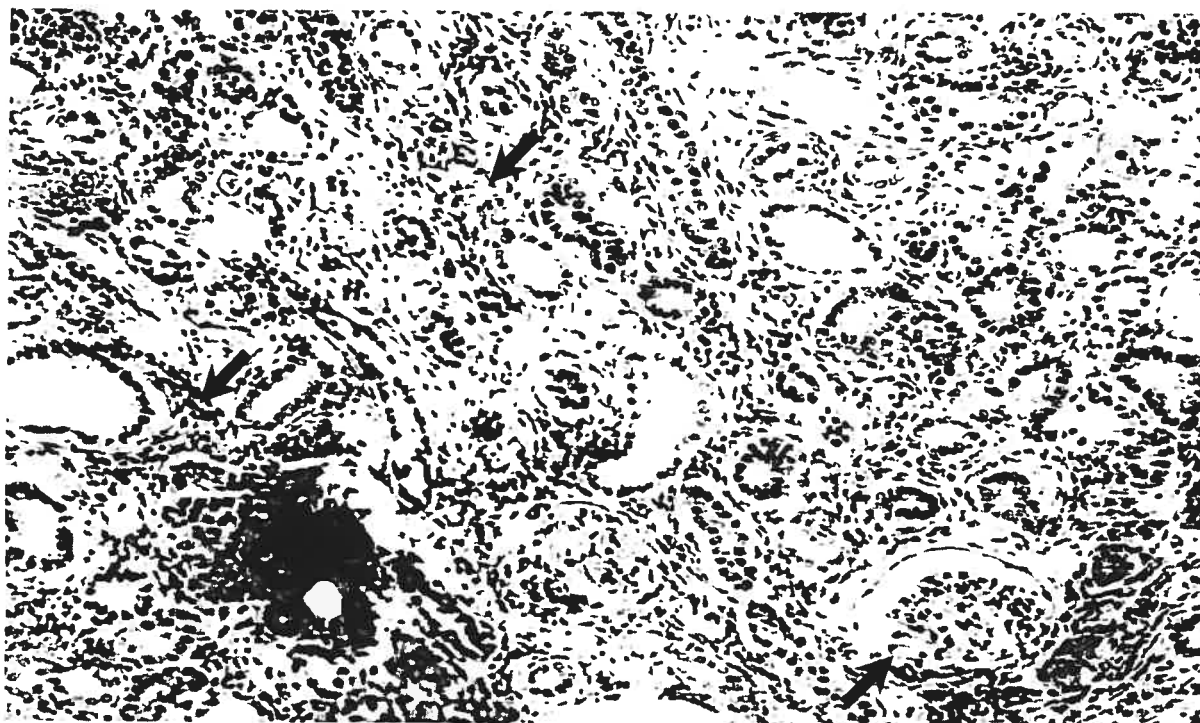
L'allogreffe #23 sacrifiée au jour 68: on peut remarquer la présence d'une sévère infiltration cellulaire diffuse. Néanmoins, les tubules et glomérules semblent normaux (↗), et aucun signe de rejet aigu sévère n'est observé. On peut également voir la présence d'un épaissement d'un vaisseau sanguin (↘), signe d'un début de rejet chronique.

FIGURE 6.2.7G. Histopathologie à l'éosine/hématoxyline de l'allogreffe rénale #24
traitée avec la thérapie combinée FK778-retardée



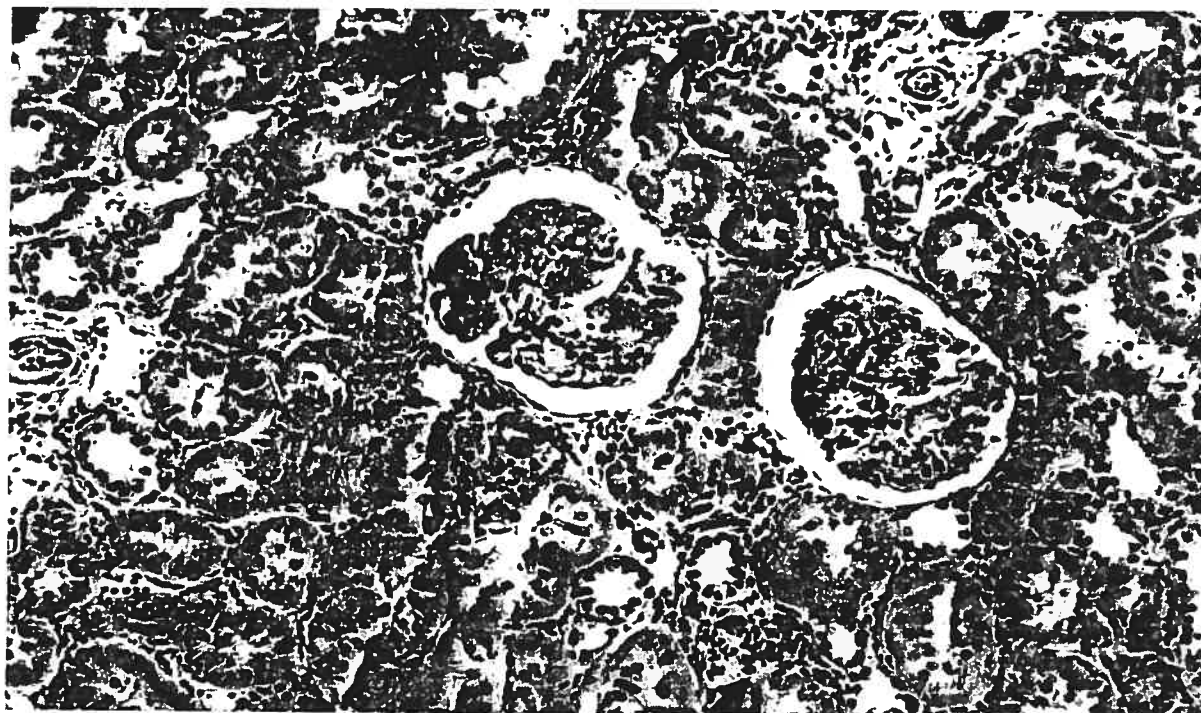
L'allogreffe #24 sacrifiée au jour 68: on peut observer une sévère infiltration cellulaire diffuse et une faible oblitération extensive des tubules (↗). Par contre, les glomérules sont quasi normaux. Aucun signe apparent de rejet aigu n'est observé. En outre, on peut voir l'épaississement d'un vaisseau sanguin (↘), signe précoce d'un rejet chronique.

FIGURE 6.2.7H. Histopathologie à l'éosine/hématoxyline de l'allogreffe rénale #26 traitée avec la thérapie combinée FK778-retardée



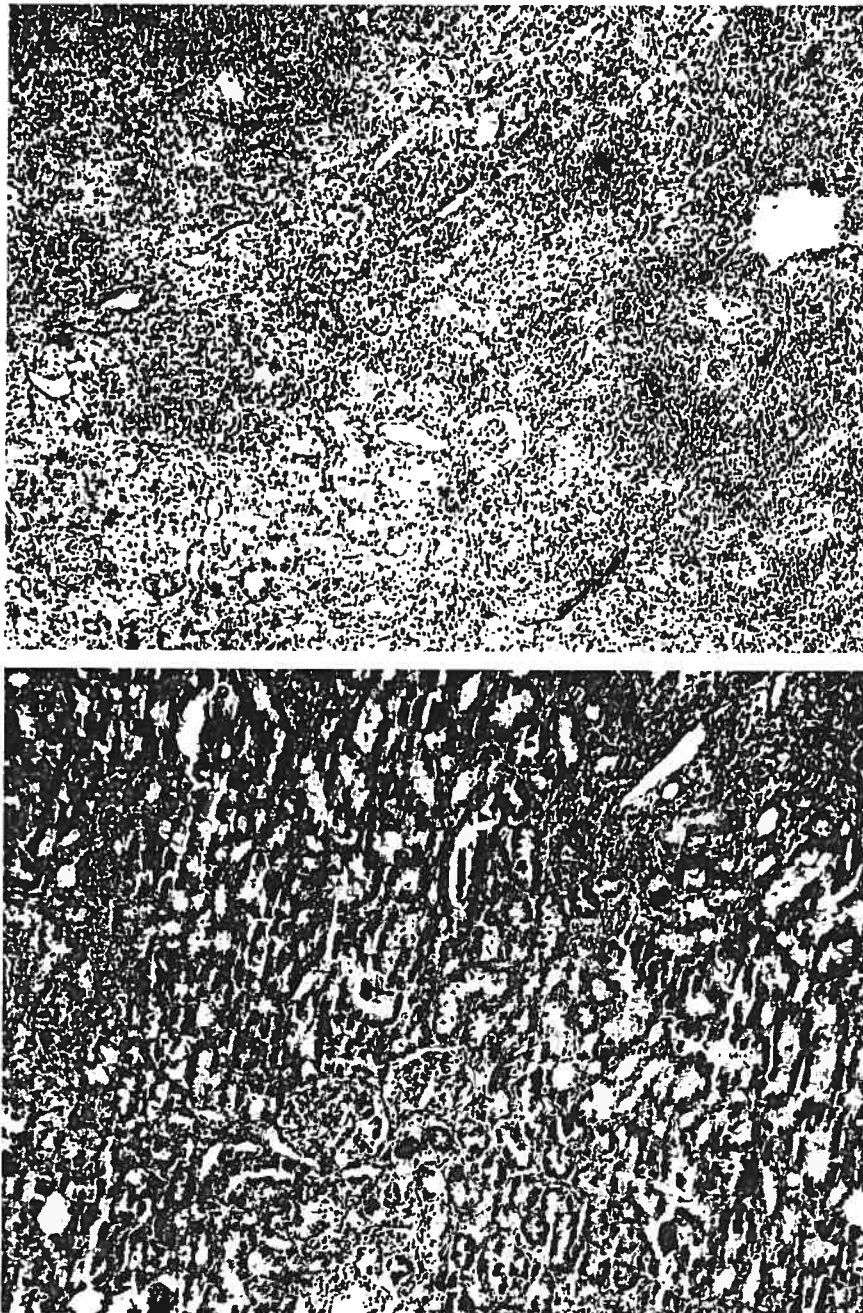
L'allogreffe #26 sacrifiée au jour 67: on peut remarquer une infiltration cellulaire diffuse modérée, en présence de glomérules normaux (↗). Il n'y a aucun signe proéminent de rejet aigu. Par contre, la présence d'une fibrose modérée et d'espaces interstitiels tubulaires suggèrent un rejet chronique précoce (↘).

FIGURE 6.2.7I. Histopathologie à l'éosine/hématoxyline de l'allogreffe rénale #28 traitée avec la thérapie combinée FK778-retardée



L'allogreffe #28 sacrifiée au jour 66: on peut remarquer que la morphologie rénale est quasi normale, avec très peu d'infiltration cellulaire localisée (↗).

FIGURE 6.2.12. Histologie comparative: allogreffes rénales traitées avec A) la thérapie combinée FK778-retardée versus B) la thérapie combinée conventionnelle



6.3 MANUSCRIT IV

Critique de la méthodologie

Modèle de l'allogreffe cardiaque chez le rat. Dans cette étude, nous avons choisi l'allogreffe cardiaque du rat comme modèle expérimental pour la simple raison que l'efficacité de la molécule WAY-160279 à prévenir contre le rejet aigu d'allogreffe n'a pas encore été démontrée auparavant, et qu'il valait mieux utiliser un modèle d'allogreffe simple pour débiter, où l'immunogénicité de l'organe n'est pas trop vigoureuse. Par contre, nous avons privilégié une combinaison d'espèces complètement allogénique BN (RT1^b) → LEW (RT1^l), puisque que nous évaluons une thérapie combinée avec le sirolimus, un agent immunosuppresseur puissant. De plus, il a été démontré qu'un traitement anti-VLA-4 seul est efficace à prévenir contre le rejet aigu dans un modèle d'allogreffe cardiaque semi-allogénique (LBNF₁ → LEW) (Coito et al., 1998). Bien que la propriété immunosuppressive de la molécule WAY-160279 n'a jamais encore été démontré dans des modèles *in vivo* ou *in vitro*, notre hypothèse de recherche ne s'est point fait à l'aveuglette puisqu'il a été rapporté que des traitements anti-VLA-4 permettent de prévenir contre le rejet d'allogreffes cardiaque, intestinale, cornéenne et pancréatique (Hori et al., 1996; Isobe et al., 1994; Yang et al., 1995; Coito et al., 1998; Tice et al., 1996). Il est alors légitime d'émettre l'hypothèse qu'une combinaison du WAY-160279 et du sirolimus peut prévenir de manière additive, voire même synergique, le rejet aigu d'allogreffe cardiaque (BN → LEW) chez le rat, puisque ces deux agents possèdent des mécanismes d'actions différents.

Interprétation des résultats

Dans le troisième chapitre de cette thèse, en référence au manuscrit IV, nous avons démontré qu'un traitement combiné de la molécule WAY-160279, un antagoniste de VLA-4, et du sirolimus produit des effets additifs à synergiques dans la prévention du rejet aigu des allogreffes cardiaques (BN → LEW) chez le rat.

Prévention du rejet d'allogreffe cardiaque: WAY-160279 et sirolimus en monothérapie. En premier lieu, des courbes dose-réponse ont été établies pour la molécule WAY-160279 et le sirolimus dans le but d'utiliser le principe de l'effet médian et l'index de combinaison pour déterminer le type d'interaction entre ces deux agents (Figures 6.3.1 et 6.3.2). De plus, comme la molécule WAY-160279 est encore au stade initial d'études précliniques, et qu'aucune donnée n'existe encore dans la littérature sur cette molécule développée comme agent immunosuppresseur, il est nécessaire d'évaluer l'efficacité de cet antagoniste du VLA-4 à prévenir contre le rejet aigu et à prolonger la survie des allogreffes cardiaques. Dans le groupe témoin non-traité, la survie des allogreffes cardiaques est de 6.5 ± 0.5 jours. Nous avons traité oralement les receveurs LEW avec trois doses sous-thérapeutiques de l'agent WAY-160279 (10, 30 et 50 mg/kg/jour), deux fois par jour, pendant 14 jours. Une dose de 10 mg/kg/jour de WAY-160279 ne prolonge pas la survie des allogreffes cardiaques, comparativement au groupe témoin (6.7 ± 0.5 jours). Cependant, les doses de 30 et 50 mg/kg/jour augmentent significativement la survie d'allogreffe à 11.8 ± 3.0 jours et 14.2 ± 2.1 jours, respectivement ($P < 0.05$). Nous avons ensuite évalué la courbe dose-réponse du sirolimus, dont l'administration s'est fait de manière intraveineuse, pendant 14 jours. Des faibles doses de sirolimus (0.02, 0.04 et 0.08 mg/kg/jour) prolongent de façon significative la survie des allogreffes cardiaques jusqu'à 15.7 ± 0.8 jours, 22.7 ± 3.4 jours et 31.5 ± 2.3 jours, respectivement ($P < 0.05$). Cette courbe dose-réponse du sirolimus en formulation intraveineuse est similaire à celle du sirolimus en formulation orale (Figure 6.1.1). Ces résultats suggèrent que la molécule WAY-160279 et le sirolimus soient efficaces pour prévenir contre le rejet aigu d'allogreffe cardiaque, malgré que la survie de l'allogreffe ne soit que faiblement prolongée avec une monothérapie de WAY-160279. Or, on peut affirmer que les doses utilisées de WAY-160279 (10, 30 et 50 mg/kg/jour) sont sous-thérapeutiques. Lorsqu'on regarde la courbe dose-réponse de la molécule WAY-160279, on peut voir que son efficacité immunosuppressive semble être dose-dépendante (Figure 6.3.1). Contrairement à l'élaboration des courbes dose-réponse dans les études précédentes, nous avons évalué au moins trois doses différentes pour

chaque agent afin de renforcer la valeur de nos résultats. Néanmoins, puisque la dose de 10 mg/kg/jour est inefficace, c'est comme si la courbe dose-réponse n'incluait que deux doses. Or, il serait adéquat d'évaluer des doses supplémentaires supérieures à 50 mg/kg/jour de WAY-160279 pour déterminer celles qui correspondent à une saturation de l'effet.

Prévention du rejet d'allogreffe cardiaque: WAY-160279 et sirolimus en combinaison. Pour évaluer la thérapie combinée du WAY-160279 et du sirolimus à prévenir contre le rejet aigu d'allogreffe cardiaque, nous avons utilisé des doses sous-thérapeutiques de WAY-160279 (10, 30 et 50 mg/kg/jour) et de sirolimus (0.02 et 0.04 mg/kg/jour). L'effet recherché d'une thérapie combinée d'agents est d'atteindre un degré acceptable d'efficacité en utilisant des doses sous-thérapeutiques de chaque agent pour éviter leurs effets secondaires dose-dépendants. De plus, puisque le temps de survie est évalué à un maximum de 60 jours, il ne fallait pas que les doses de WAY-160279 et de sirolimus ne soient trop élevées. Lorsque les rats receveurs LEW sont traités pendant 14 jours avec une association de faibles doses de WAY-160279 et de sirolimus (WAY 30 mg/kg/jour + SIR 0.02 mg/kg/jour), le temps de survie d'allogreffe a augmenté significativement jusqu'à 24.7 ± 1.9 jours, comparativement aux groupes de monothérapie au WAY-160279 30 mg/kg/jour (11.8 ± 3.0 jours; $P < 0.001$) ou au sirolimus 0.02 mg/kg/jour (15.7 ± 0.8 jours; $P = 0.011$). Selon le principe de l'effet médian, l'interaction entre le WAY-160279 et le sirolimus à ces doses sous-thérapeutiques est légèrement synergique (CI= 0.894). De plus, un traitement de WAY-160279 (50 mg/kg/jour) combiné au sirolimus (0.02 mg/kg/jour) a prolongé la survie des allogreffes cardiaques de manière synergique jusqu'à 24.7 ± 1.9 jours, comparativement à chaque agent seul ($P < 0.001$, CI= 0.678). Lorsqu'on augmente les doses de sirolimus à 0.04 mg/kg/jour, on peut observer qu'une combinaison avec l'agent WAY-160279 (10 mg/kg/jour) permet de prolonger de manière plutôt additive la survie des allogreffes cardiaques à 24.0 ± 1.7 jours (CI= 0.970). Cette prolongation n'est cependant pas significative lorsque comparée au traitement de sirolimus seul

(22.7 ± 3.4 jours). Par ailleurs, un traitement de WAY-160279 (30 mg/kg/jour) et de sirolimus (0.04 mg/kg/jour) a prolongé de manière fortement synergique la survie des allogreffes à 41.3 ± 8.2 jours (CI= 0.232). De façon similaire, un traitement de WAY-160279 (50 mg/kg/jour) et de sirolimus (0.04 mg/kg/jour) a prolongé de manière fortement synergique la survie des allogreffes jusqu'à 44.3 ± 12.4 jours (CI= 0.232). Il est important de noter que puisque la survie des allogreffes est évaluée jusqu'à un maximum de 60 jours, la valeur de survie du groupe de combinaison WAY-160279 (50 mg/kg/jour) + sirolimus (0.04 mg/kg/jour) est plafonnée, et que le temps de survie réel est sûrement prolongé davantage, voire que le degré de synergie doit également être plus fort.

Malgré les résultats préliminaires encourageants, la plus grande faiblesse de cette étude est le fait qu'elle ne comporte qu'un seul paramètre d'évaluation pour le rejet aigu. En effet, tel que discuté dans la partie discussion du manuscrit I, l'évaluation de la fonction cardiaque par palpation transabdominale est une méthode indirecte pour déterminer le rejet aigu. Même si une observation macroscopique des allogreffes cardiaques a été effectuée après le sacrifice des receveurs dont l'activité contractile de l'allogreffe était indétectable par palpation (une allogreffe cardiaque rejetée est normalement hypertrophiée et de couleur très prononcée), il aurait été plus adéquat d'effectuer une évaluation histologique des allogreffes pour confirmer qu'il s'agit bien d'un rejet aigu. Tout comme les autres organes solides, l'immunopathologie du rejet d'allogreffe cardiaque implique un phénomène cellulaire et humoral. En clinique, la biopsie de l'endomyocarde du ventricule droit, originalement décrite par Caves et al. (1973), demeure la méthode de choix pour évaluer la présence du rejet dans l'allogreffe cardiaque des receveurs (Cary et al., 2001). La présence d'une infiltration lymphocytaire dans le myocarde, autant en terme de fonction (par exemple, endommager les myocytes) que d'intensité, constitue la base des systèmes de classification pour évaluer la sévérité du rejet cardiaque. En effet, le rejet aigu cellulaire est un facteur de détection potentiel, résultant en des signes cliniques de mauvaise fonction significative de

l'allogreffe cardiaque comme l'arythmie aiguë ou la défaillance cardiaque. Certains cliniciens vont mettre l'emphasis sur l'importance de la réponse humorale dans le rejet, et réclament donc une évaluation immunohistologique afin de détecter la présence d'anticorps et de complément dans les biopsies (Hammond et al., 1989). Cependant, il faut tenir compte que les phénomènes humoraux résultent habituellement en une infiltration cellulaire. Or, l'infiltration cellulaire dans l'allogreffe cardiaque semble être le facteur par excellence pour déterminer le rejet d'organe. Depuis 1990, il existe un système de classification standardisé, établi par l'*International Society of Heart Transplantation*, pour évaluer la sévérité du rejet cardiaque: la classification ISHLT 1990 (Billingham et al., 1990). Dans notre étude citée dans le second chapitre (manuscrit I), nous avons omis d'effectuer une évaluation histologique des allogreffes traitées avec la thérapie combinée du sirolimus et du mycophénolate mofétil, mais nous avons évalué cette combinaison dans trois modèles expérimentaux différents. Dans la présente étude, nous avons évalué la combinaison du WAY-160279 et du sirolimus que dans un seul modèle expérimental. Or, dans le but de donner plus d'impact à l'étude, il aurait été adéquat d'effectuer une évaluation histopathologique des allogreffes cardiaques à l'éosine/hématoxyline afin d'identifier les signes d'un rejet aigu cardiaque tels une infiltration interstitielle de cellules mononucléaires, de l'œdème, une nécrose des myocytes, voire une vasculite. En outre, une évaluation immunohistochemique des allogreffes cardiaques pour identifier l'infiltration des lymphocytes T auxiliaires (CD4⁺) ou cytotoxiques (CD8⁺) ou des macrophages (ED1⁺) aurait été également de rigueur. L'immunohistochemie est une méthode qui permet de détecter une protéine particulière qui représente un type cellulaire ou une caractéristique spécifique sur des coupes tissulaires, dans laquelle l'anticorps est chimiquement couplé à un enzyme qui convertit une substance incolore en un produit coloré insoluble, et dont le dépôt peut être directement observé en microscopie optique. Ainsi, si on détecte de la fluorescence sur une coupe histologique d'allogreffe après avoir traité celle-ci avec un anticorps anti-ED1 couplé à la peroxydase, on peut interpréter ce signal positif comme étant la présence de

macrophages dans l'allogreffe, puisque ED1 est une molécule de surface spécifique aux macrophages.

FIGURE 6.3.1. Courbe dose-réponse de la molécule WAY-160279 dans la prévention du rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez le rat (BN → LEW)

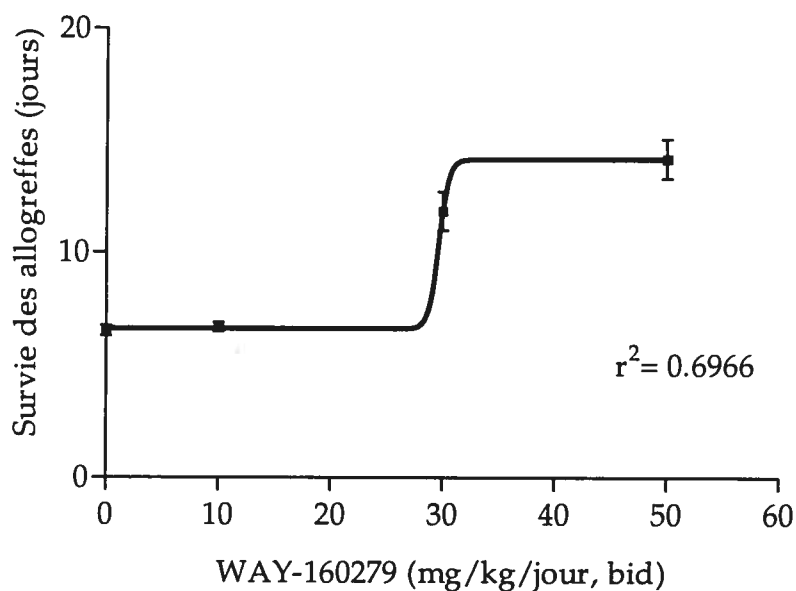
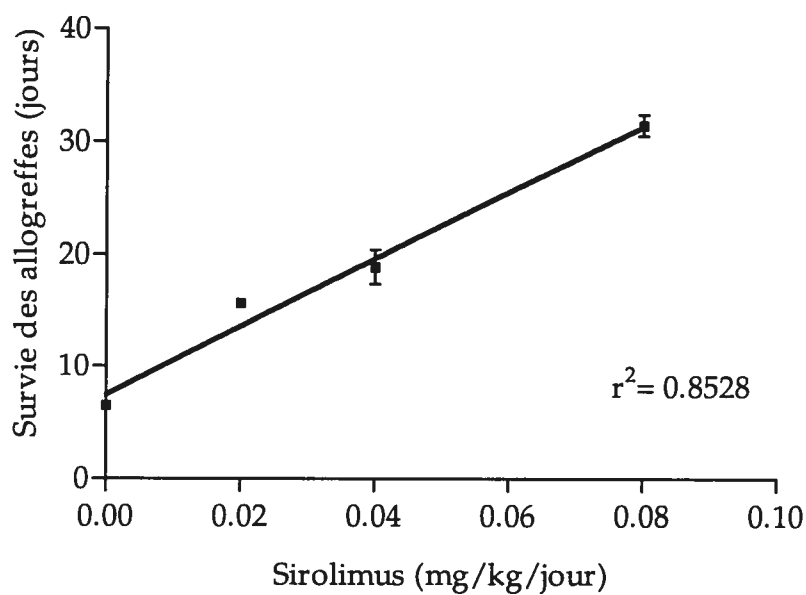


FIGURE 6.3.2. Courbe dose-réponse du sirolimus dans la prévention du rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez le rat (BN → LEW)



6.4 MANUSCRIT V

Critique de la méthodologie

Modèle de l'allogreffe rénale chez le rat. Dans cette étude, nous avons choisi l'allogreffe rénale du rat avec une combinaison d'espèces complètement allogénique ACI (RT1^a) → LEW (RT1^b) comme modèle expérimental puisque, contrairement au WAY-160279, l'efficacité du rPSGL-Ig a déjà été démontrée à prévenir contre les dommages de l'ischémie/reperfusion dans un modèle d'allogreffe rénale chez le rat (Fuller et al., 2001; Takada et al., 1997).

Protocole d'immunosuppression. Le protocole d'immunosuppression consiste à un traitement de l'allogreffe au rPSGL-Ig durant la période d'ischémie froide, suivi d'un traitement des receveurs avec le rPSGL-Ig par voie intraveineuse en combinaison avec un immunosuppresseur oral dit conventionnel (le sirolimus, le tacrolimus, la cyclosporine ou le mycophénolate mofétil), durant trois jours posttransplantation. Dans cette étude, nous avons réduit le nombre de jours de traitement des receveurs puisqu'il a été suggéré qu'un traitement de trois jours avec des faibles doses de cyclosporine permette de prolonger faiblement la survie des allogreffes de façon significative, mais non de manière trop vigoureuse (communication personnelle). Il est à noter que le but de cette étude préliminaire n'est point de déterminer le type d'interaction entre le rPSGL-Ig et les différents immunosuppresseurs, mais d'avoir une idée générale de l'efficacité du rPSGL-Ig et voir s'il y avait un certain bénéfice à utiliser le rPSGL-Ig en combinaison avec un agent immunosuppresseur efficace comme traitement préventif contre le rejet aigu d'allogreffe vascularisée. Or, nous avons jugé que le principe de l'effet médian et l'index de combinaison ne sont pas nécessaires dans une telle étude préliminaire. Cependant, il serait nécessaire d'utiliser cette méthode dans des études de combinaison plus approfondies, c'est-à-dire comportant des groupes avec différentes associations de doses.

Évaluation de la présence de la protéine recombinante rPSGL-Ig dans le sang.

Dans une élégante étude, Khor et al. (2000) ont évalué les paramètres de pharmacocinétiques et pharmacodynamiques du rPSGL-Ig chez la souris, le rat, le porc, le primate non-humain et l'humain. Les auteurs rapportent que la demi-vie du rPSGL-Ig est de 100 ± 19 heures chez le rat. Puisque la demi-vie indique le temps requis pour que le corps élimine de moitié la quantité d'agent dans le sang, et que la règle en pharmacologie stipule que l'agent est quasi totalement éliminé après 6 demi-vies ($\approx 97\%$), cela veut dire que ça prend plus de 25 jours (≈ 600 heures) pour que le rPSGL-Ig soit complètement éliminé chez le rat, et ce avec qu'un seul traitement intraveineux de rPSGL-Ig. Néanmoins, il aurait été préférable d'évaluer les niveaux plasmatiques de rPSGL-Ig chez les receveurs, juste pour s'assurer que le rPSGL-Ig est bel et bien présent dans le sang, voire qu'il n'y ait pas eu de problème technique lors de l'injection intraveineuse du rPSGL-Ig chez l'animal.

Évaluations histologiques et fonction rénale. Nous avons effectué une évaluation histologique à l'éosine/hématoxyline sur les allogreffes dont la survie est de plus de 60 jours, pour confirmer que ces allogreffes ne représentent pas ou peu de signes apparents de rejet aigu (par exemple, une sévère infiltration diffuse des cellules mononucléaires, une oblitération extensive des tubules, une présence de nécrose et d'hémorragie, et une perte ou un endommagement des glomérules; Thiru et al., 2000). Une allogreffe rénale fonctionnelle est représentée par un niveau de créatinine plasmatique inférieur à 7 mg/dL chez le receveur. Il aurait été édifiant d'effectuer des coupes histologiques sur toutes les allogreffes des différents groupes, mais nous avons jugé qu'il n'en était point nécessaire puisque la fonction rénale est déjà altérée, voire que le rejet aigu soit déjà à un stade avancé.

Interprétation des résultats

Dans le quatrième chapitre de cette thèse, en référence au manuscrit V, nous avons démontré qu'une thérapie au rPSGL-Ig, un inhibiteur de la P-sélectine, combinée

avec la cyclosporine permet de prolonger de manière significative la survie des allogreffes, mais pas avec le sirolimus, le tacrolimus ou le mycophénolate mofétil dans un modèle de transplantation rénale (ACI → LEW) chez le rat.

Monothérapies au rPSGL-Ig, sirolimus, tacrolimus, cyclosporine, et mycophénolate mofétil dans la prévention du rejet d'allogreffe rénale. Dans cette étude préliminaire, nous voulons vérifier si la combinaison du rPSGL-Ig avec un immunosuppresseur conventionnel est bénéfique pour prévenir contre le rejet aigu. Tout d'abord, nous avons évalué les agents en monothérapie. Dans le groupe témoin non-traité, la survie des allogreffes rénales est de 7.5 ± 0.9 jours. Une thérapie avec le rPSGL-Ig consiste à un prétraitement (rPSGL-Ig 100 μ g) de l'allogreffe rénale durant la période d'ischémie froide, suivi d'un traitement intraveineux (rPSGL-Ig 100 μ g) chez le receveur juste avant la reperfusion de l'allogreffe. Dans le groupe traité avec une thérapie au rPSGL-Ig seul, la survie des allogreffes n'est pas prolongée (6.5 ± 0.8 jours), comparativement au groupe témoin. Malgré que le groupe de monothérapie au rPSGL-Ig semble avoir une survie d'allogreffe sensiblement inférieure au groupe témoin, ceci n'est pas significativement différent ($P=0.065$). On peut alors affirmer que la thérapie avec la protéine de fusion rPSGL-Ig ne semble pas nuire à la survie de l'allogreffe, et que cette dose utilisée est sous-thérapeutique. Nous avons ensuite évalué le sirolimus (0.8 mg/kg/jour), le tacrolimus (1 mg/kg/jour), la cyclosporine (4 mg/kg/jour) et le mycophénolate mofétil (10 mg/kg/jour) en monothérapie. Tous les agents, sauf le mycophénolate mofétil, ont faiblement prolongé, mais de manière significative, la survie des allogreffes rénales à 9.8 ± 2.1 jours ($P=0.032$), 12.3 ± 5.0 jours ($P=0.043$), 9.5 ± 2.1 jours ($P=0.053$), et 8.2 ± 0.2 jours ($P=0.200$), respectivement.

Thérapie combinée du rPSGL-Ig et du sirolimus, tacrolimus, cyclosporine ou mycophénolate mofétil dans la prévention du rejet d'allogreffe rénale. Dans un second temps, nous avons évalué les différents groupes de thérapie combinée d'un immunosuppresseur conventionnel avec la protéine de fusion rPSGL-Ig à prévenir

contre le rejet aigu d'allogreffe rénale. De manière décevante, les combinaisons du rPSGL-Ig (100 µg traitement d'allogreffe + 100 µg traitement du receveur) avec le sirolimus (0.8 mg/kg/jour), le tacrolimus (1 mg/kg/jour) ou le mycophénolate mofétil (10 mg/kg/jour) échouent de prolonger la survie des allogreffes rénales, lorsque comparées aux monothérapies (respectivement, 9.4 ± 1.1 jours; 14.4 ± 7.5 jours; 9.6 ± 0.9 jours). Cependant, lorsque le rPSGL-Ig est combiné avec la cyclosporine (4 mg/kg/jour), la survie des allogreffes rénales est prolongée significativement jusqu'à 50.8 ± 37.2 jours ($P < 0.05$). Il est à noter qu'il aurait été pertinent d'inclure plus d'animaux ($n > 6$) dans ce groupe afin de réduire la déviation standard élevée. Cependant, un test statistique du *Student t* non pairé, confirme la différence statistique entre le groupe de combinaison et les groupes de monothérapies respectives.

CHAPITRE VII

DISCUSSION ET CONCLUSION

7.1 DISCUSSION

L'objectif global de cette thèse de doctorat consiste à évaluer de nouvelles thérapies immunosuppressives pour prévenir contre le rejet aigu d'allogreffes vascularisées, dans l'espoir de découvrir des agents immunosuppresseurs avec un meilleur profil pharmacologique que les traitements conventionnels utilisés en clinique. Deux problématiques majeures en transplantation clinique demeurent les épisodes de rejet d'organe et les effets secondaires importants des protocoles d'immunosuppression actuels. La thérapie combinée est une simple stratégie qui consiste à utiliser de faibles doses d'agents immunosuppresseurs afin d'optimiser l'efficacité à prévenir contre le rejet aigu, tout en minimisant les effets indésirables dose-dépendants de chaque agent. Cependant, la combinaison des agents doit être appropriée, c'est-à-dire qu'elle doit inclure des immunosuppresseurs qui possèdent des mécanismes d'action et/ou des effets secondaires différents. Notre hypothèse de recherche stipule qu'une association appropriée de faibles doses d'agents immunosuppresseurs peut potentiellement prévenir contre le rejet aigu de manière synergique tout en minimisant les effets indésirables dose-dépendants et spécifiques à chaque agent. Cette thèse de doctorat rapporte l'évaluation de quatre nouvelles thérapies immunosuppressives comme traitement préventif et de prophylaxie contre le rejet aigu d'allogreffes vascularisées: 1) le mycophénolate mofétil et le sirolimus, 2) le malononitrilamide FK778 et le tacrolimus, 3) le WAY-160279 et le sirolimus, voire 4) le rPSGL-Ig et la cyclosporine. Nous avons démontré que ces thérapies combinées permettent de prévenir et traiter contre le rejet aigu d'organes vascularisés en prolongeant de manière additive ou synergique la survie des allogreffes cardiaques, pancréatiques et/ou rénales chez le rat. De plus, des faibles doses sont utilisées. En employant des doses sous thérapeutiques de chaque agent immunosuppresseur mis en combinaison, on évite donc les effets secondaires et les toxicités reliés à chaque immunosuppresseur. La théorie la plus simple et plausible des effets synergiques et additifs produits par ces traitements combinés s'explique par le fait que les deux agents mis en association possèdent des mécanismes d'action distincts,

c'est-à-dire des immunosuppresseurs qui agissent sur différentes molécules impliquées dans l'activation et la prolifération des lymphocytes ou des agents qui interfèrent à des étapes apparentes du processus de rejet aigu (par exemple, à différents stades du cycle cellulaire). Les effets immunosuppresseurs en sont alors potentialisés. Nous avons rapporté que la combinaison du sirolimus et du mycophénolate mofétil produit des effets synergiques dans la prévention du rejet aigu des allogreffes cardiaques, pancréatiques et rénales, ainsi que dans le traitement du rejet aigu installé de l'allogreffe cardiaque chez le rat. Le sirolimus et le mycophénolate mofétil sont des agents immunosuppresseurs de faible poids moléculaire qui possèdent des mécanismes d'action cellulaires et moléculaires différents. Le mécanisme d'action du sirolimus implique l'inhibition de la protéine multifonctionnelle mTOR, tandis que le mycophénolate mofétil, un inhibiteur de la synthèse des nucléotides, inhibe la synthèse *de novo* des purines via le blocage de l'enzyme IMPDH. En outre, le sirolimus et le mycophénolate mofétil agissent à des étapes différentes du cycle cellulaire. Le sirolimus bloque le début de la phase G₁-S, pendant que le mycophénolate mofétil inhibe durant la phase S-G₂. De manière vulgarisée, on peut s'imaginer que les signaux d'activation lymphocytaire que le sirolimus échoue d'inhiber en G₁-S, le mycophénolate mofétil en aura la possibilité de bloquer en fin de la phase S-G₂ du cycle cellulaire (Figure 7.1.1). Il est alors légitime d'avancer comme hypothèse que les effets synergiques immunosuppresseurs observés avec la thérapie combinée du sirolimus et du mycophénolate mofétil sont principalement dus au fait que ces agents empruntent des mécanismes d'action cellulaires et moléculaires distincts, voire qu'ils agissent à des étapes différentes du cycle cellulaire. Nous avons également démontré que la combinaison du malononitrilamide FK778 et du tacrolimus permet de prolonger de manière synergique la survie des allogreffes rénales chez le rat. Le FK778 et le tacrolimus sont des agents immunosuppresseurs xénobiotiques avec des mécanismes d'action cellulaires et moléculaires distincts. Le FK778 est un inhibiteur de la synthèse de nucléotides qui interfère avec la voie de synthèse *de novo* des pyrimidines via le blocage de l'enzyme DHODH. Le tacrolimus est un inhibiteur de la calcineurine et son

mécanisme d'action principal consiste à interférer avec la transcription de gènes des cytokines (par exemple, l'IL-2). De plus, le tacrolimus favorise la production de TGF- β , une cytokine qui possède des propriétés immunosuppressives. L'effet synergique observé dans la prolongation de la survie des allogreffes peut s'expliquer par le fait que le malononitrilamide FK778 et le tacrolimus possède des mécanismes d'action différents. En effet, le FK778 et le tacrolimus agissent à des étapes différentes du cycle cellulaire. Le tacrolimus bloque le début de la phase G₁-S, pendant que le FK778 inhibe durant la phase S-G₂. De manière vulgarisée, on peut également s'imaginer que les signaux d'activation lymphocytaire que le tacrolimus échoue d'inhiber en G₁-S, le FK778 en aura la possibilité de bloquer en fin de la phase S-G₂ du cycle cellulaire (Figure 7.1.1). En outre, nous avons démontré que la combinaison de la molécule WAY-160279 et du sirolimus produit des effets bénéfiques (additifs à synergiques) dans la prévention du rejet aigu des allogreffes cardiaques chez le rat. Les agents WAY-160279 et sirolimus possèdent des mécanismes d'action différents, et ils agissent à des étapes distinctes du processus de rejet d'organe. Le mécanisme d'action du sirolimus implique l'inhibition de la protéine multifonctionnelle mTOR, résultant en un blocage de l'effet de certaines cytokines importantes dans l'activation du lymphocyte T (par exemple, l'IL-2, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15, et l'IL-21). Ainsi, le sirolimus bloque la progression du cycle cellulaire du lymphocyte, initiée par ces facteurs de croissance, au début de la phase G₁-S. La molécule WAY-160279 a été développée comme antagoniste de la molécule d'adhésion VLA-4. Contrairement aux immunosuppresseurs de faible poids moléculaire, comme les inhibiteurs de la calcineurine ou de mTOR, ou les inhibiteurs de la synthèse de nucléotides, le mécanisme d'action du WAY-160279 n'implique pas l'inhibition du processus d'activation, de différenciation et de prolifération des lymphocytes, mais plutôt l'inhibition de l'étape de la ferme adhésion entre les leucocytes activés et l'endothélium, lors de la réponse inflammatoire. Ainsi, il bloque le recrutement et la rétention des lymphocytes T effecteurs et mémoires, et d'autres leucocytes dans l'allogreffe. De manière vulgarisée, on peut s'imaginer que même si le sirolimus échoue d'inhiber l'activation des lymphocytes au début de la phase G₁-S du

cycle cellulaire, le WAY-160279 va bloquer la transmigration des lymphocytes T activés et le recrutement des lymphocytes T effecteurs et mémoires dans l'allogreffe (Figure 7.1.1). Il est alors justifié d'avancer comme hypothèse que les effets bénéfiques immunosuppresseurs (additifs à synergiques) observés avec la thérapie combinée du WAY-160279 et du sirolimus sont principalement dus au fait que ces agents empruntent des mécanismes d'action distincts, voire qu'ils agissent à des étapes différentes du rejet aigu d'allogreffe. En addition, VCAM-1 est une molécule d'adhésion qui est exprimée tardivement sur les cellules endothéliales en réponse à des cytokines (par exemple, le $\text{TNF-}\alpha$), et son intensité d'expression maximale survient après 36 heures. Il est donc plus prudent d'utiliser le WAY-160279 en combinaison avec un agent immunosuppresseur qui agira dans la phase précoce du rejet aigu, comme le sirolimus. Enfin, nous avons rapporté que la thérapie combinée de la protéine de fusion rPSGL-Ig et de la cyclosporine, administrée de manière succincte, produise des effets bénéfiques dans la prévention du rejet aigu des allogreffes rénales chez le rat. Le rPSGL-Ig est un agent biologique conçu pour bloquer l'interaction entre les molécules d'adhésion P-sélectine et PSGL-1. En conséquence, le roulement leucocytaire et la transmigration des leucocytes vers l'allogreffe régis par l'interaction entre les lymphocytes et les cellules endothéliales ou les plaquettes sont inhibés. La cyclosporine est un inhibiteur de la calcineurine et son mécanisme d'action principal consiste à interférer avec la transcription de gènes des cytokines (par exemple, l'IL-2) et favoriser la production de $\text{TGF-}\beta$. La cyclosporine bloque le début de la phase G_1 -S, tandis que le rPSGL-Ig inhibe la transmigration et le recrutement des lymphocytes T activés, effecteurs et mémoires dans l'allogreffe, les lymphocytes dits « chanceux » qui ont échappé au traitement inhibiteur de la cyclosporine (Figure 7.1.1).

Résultats inattendus

Bien que notre hypothèse de départ soit confirmée dans son ensemble, à savoir qu'une combinaison d'agents immunosuppresseurs avec des mécanismes d'action différents produise des effets additifs voire même synergiques dans la prévention du

rejet aigu d'allogreffes vascularisées, certains résultats inattendus suscitent d'importantes interrogations quant aux mécanismes moléculaires et cellulaires de quelques combinaisons d'agents testées: Pourquoi la combinaison *in vitro* du malononitrilamide FK778 et du tacrolimus est-elle synergique chez les lymphocytes B, et non pas chez les lymphocytes T? Quelles sont les hypothèses plausibles qui pourraient expliquer qu'il est plus avantageux de retarder l'administration *in vivo* du FK778 au jour 7 posttransplantation, plutôt qu'une administration concomitante conventionnelle? Pourquoi la cyclosporine est-elle le seul immunosuppresseur conventionnel (et pas le tacrolimus, le sirolimus ou le mycophénolate mofétil) à produire des effets bénéfiques lorsque administrée de manière concomitante avec le rPSGL-Ig? Ces intéressantes questions soulevées méritent d'être discutées plus en profondeur.

« *Pourquoi les lymphocytes B, et non pas les lymphocytes T ?* ». Nous avons démontré que la thérapie combinée du FK778 et du tacrolimus produit des effets synergiques dans l'inhibition de la prolifération chez les lymphocytes B, mais des effets antagonistes chez les lymphocytes T. Il est possible mais peu probable que le contenu en pyrimidines soit différent entre les lymphocytes T et B. Or, une hypothèse qui pourrait expliquer ce phénomène dichotomique entre ces deux types cellulaires demeure que les lymphocytes B soient plus sensibles à l'effet du FK778 que ne le sont les lymphocytes T. En effet, les lymphocytes B semblent avoir un plus grand recours en synthèse d'acides nucléiques (dans ce cas-ci, les pyrimidines) comparativement aux lymphocytes T. Bien qu'il n'existe aucune référence dans la littérature qui prouve cette affirmation hypothétique, il est connu qu'en général les agents inhibiteurs d'acides nucléiques (par exemple, le mycophénolate mofétil, le leflunomide, le déoxyspergualine, etc.) ont un plus grand impact sur les lymphocytes B et la réponse humorale. D'ailleurs, il a été rapporté que le leflunomide et le déoxyspergualine inhibe l'expression de NF- κ B, un facteur de transduction important dans l'activation des lymphocytes B (Manna et al., 2000; Nadler et al., 1995). Il est alors légitime de croire que dans la réponse allogénique,

les mécanismes effecteurs des lymphocytes B requièrent la synthèse d'un plus grand nombre de protéines (par exemple, lors de la production d'immunoglobulines) comparativement aux lymphocytes T, et qu'un déficit en acides nucléiques occasionné par le FK778, un inhibiteur de la synthèse des pyrimidines, aurait une plus grande répercussion sur les lymphocytes B, voire sur la réponse humorale.

« Pourquoi privilégier la combinaison FK778-retardée plutôt que la thérapie combinée conventionnelle? » D'après nos résultats *in vitro*, nous avons évalué l'effet *in vivo* de cette thérapie combinée en retardant le traitement de FK778 au jour 7 posttransplantation, mais tout en maintenant l'administration du tacrolimus dès le jour de transplantation. Nous avançons comme hypothèse que ce protocole d'immunosuppression est une stratégie qui permet d'éviter la possibilité d'effets antagonistes chez les lymphocytes T durant la première semaine posttransplantation, période précoce du rejet aigu où les lymphocytes T jouent un rôle critique dans l'initiation de la réponse allogénique (Figure 7.1.2), tout en bénéficiant des effets synergiques chez les lymphocytes B durant la période tardive du rejet aigu, où les lymphocytes B ont eu le temps nécessaire pour se différencier en plasmocytes et produire des anticorps spécifiques contre l'allogreffe (Figure 7.1.3). Pour vérifier si cette hypothèse avancée est plausible dans notre modèle d'étude, il serait intéressant d'effectuer quelques expériences au niveau cellulaire et moléculaire pour prouver ou infirmer notre hypothèse de départ: i) Évaluation de la combinaison FK778-retardée sur la réponse humorale. A) Il a été rapporté que les anticorps IgG anti-donneur jouent un rôle important dans le rejet aigu d'allogreffe rénale chez le rat (Majoor et al., 1983). Récemment, Wu et al. (2002) ont démontré qu'il existe une corrélation directe entre le niveau de production d'anticorps spécifiques au donneur et la défaillance de l'allogreffe rénale. Dans la réponse allogénique de type humorale, la production d'anticorps IgG spécifiques contre le donneur demeure le mécanisme effecteur principal des lymphocytes B. Nous avançons comme hypothèse que l'effet *in vivo* de la thérapie combinée FK778 et tacrolimus cible particulièrement les lymphocytes B plutôt que les lymphocytes T. Pour évaluer cette théorie, il serait

intéressant de vérifier si l'effet de la combinaison FK778-retardée inhibe la production d'anticorps IgG allospécifiques anti-donneur ACI chez le receveur, et d'en faire la comparaison avec les receveurs des groupes témoins y compris ceux traités avec la thérapie combinée administrée de manière conventionnelle. Pour ce faire, il suffit de récolter le sérum des rats receveurs qui ont été traités avec la combinaison FK778-retardée et ceux qui ont été traités avec la thérapie combinée conventionnelle. En incubant les lymphocytes T purifiés des rats donneurs ACI avec le sérum des rats receveurs LEW traités avec les différents traitements, et ensuite avec un anticorps anti-IgG de rat conjugué à un fluorochrome (par exemple, FITC ou PE), on est capable de détecter par cytométrie en flux la présence d'IgG spécifiques contre les cellules du donneur ACI dans le sérum des rats receveurs LEW. En effectuant cette expérience, on serait en mesure de vérifier si la prolongation de la survie des allogreffes rénales corrèle avec l'effet de la combinaison FK778-retardée à réduire la production d'anticorps IgG spécifiques contre l'allogreffe. S'il y a présence d'anticorps IgG anti-donneur ACI dans le sérum des receveurs LEW, ils se lieront aux lymphocytes du donneur ACI. En incubant ces lymphocytes avec un anticorps anti-IgG de rat conjugué à un fluorochrome, on peut alors détecter la quantité d'anticorps IgG spécifiques contre le donneur ACI dans le sérum des receveurs LEW. Il est à noter qu'il n'est pas nécessaire d'évaluer la présence d'anticorps IgM spécifiques contre le donneur puisque des études ont rapporté que la présence d'IgM anti-donneur dans le sérum des receveurs allotransplantés n'est pas un bon indicateur de rejet d'allogreffe, voire même que la présence d'anticorps IgM peut être bénéfique à la survie des allogreffes (Przybylowski et al., 1999). En outre, il serait intéressant de comparer les niveaux d'anticorps IgG spécifiques au donneur dans le sérum des receveurs des différents groupes de monothérapie (FK778 ou tacrolimus), ainsi que ceux des différents groupes de combinaison (conventionnelle *versus* FK778-retardée *versus* FK778-prétraitée), à des intervalles de temps précis, où les allogreffes ne sont pas encore complètement rejetées. Ainsi, on pourrait confirmer que la thérapie combinée du FK778 et du tacrolimus permet d'inhiber de façon synergique la production d'anticorps spécifiques anti-

donneur, et non pas que cet effet ne soit seulement dû qu'au FK778, puisqu'une étude menée par Yuh et al. (1995) rapporte que le leflunomide inhibe la production d'anticorps IgG et IgM spécifiques contre le donneur, dans un modèle d'allogreffe et de xénogreffe pulmonaire chez le rat. Puisque le mécanisme effecteur principal des lymphocytes B demeure la production d'anticorps, l'évaluation du taux d'anticorps spécifiques par la cytométrie en flux représente une technique simple, efficace et précise. B) La protéine Bruton's tyrosine kinase (BTK) joue un rôle important dans la transduction des signaux intracellulaires menant à l'activation et la prolifération des lymphocytes B (Khan et al., 2001). Des récentes études ont rapporté qu'un analogue du leflunomide, LFM-A13, possède des propriétés anti-cancéreuses en bloquant BTK (Uckun et al., 2002 ; Mahajan et al., 1999). Cependant, il n'existe aucune référence dans la littérature rapportant que les malononitrilamides bloquent la transduction des signaux via l'inhibition de la protéine BTK. Il est donc légitime d'émettre comme hypothèse que le malononitrilamide FK778 inhibe l'activation et la prolifération des lymphocytes B via un blocage de la tyrosine kinase BTK, puisque le FK778 est également un analogue du leflunomide. La méthode la plus appropriée pour évaluer cette hypothèse demeure la technique *in vivo* du CFSE (*carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*). Le CFSE est un fluorochrome à propriété unique puisqu'il permet d'évaluer l'historique de la division cellulaire d'une population distincte (par exemple, les lymphocytes B) sur le plan individuel, de manière simultanée avec le profil d'expression des molécules de surface ou des marqueurs intracellulaires lors de la réponse allogénique (Lyons et al., 1994). Le CFSE est un fluorochrome non toxique et lipophile qui se lie de manière covalente à des protéines intracellulaires et qui émet une fluorescence à des longueurs d'onde distinctes. Ainsi, la quantité de CFSE est également distribuée à chaque cellule fille lors de la division cellulaire, résultant en une émission de la moitié de l'intensité de fluorescence après chaque génération. De cette façon, on est capable de vérifier si un traitement au FK778 permet d'inhiber la prolifération des lymphocytes B via l'inhibition de l'expression de la tyrosine kinase BTK. Pour ce faire, il suffit de marquer des splénocytes allogéniques (par exemple, provenant d'une souris C57BL/6, H-2^b) avec le

CFSE, d'injecter de manière intraveineuse ces splénocytes marqués au CFSE par transfert adoptif chez un receveur allogénique (par exemple, une souris DBA/2, H-2^d) préalablement irradié donc exempt de lymphocytes, de traiter le receveur avec différents traitements immunosuppresseur pendant cinq jours, de sacrifier le receveur cinq jours après le transfert adoptif pour y récolter la rate et y isoler les splénocytes, de marquer ces splénocytes avec des anticorps anti-CD19 (marqueur de surface des lymphocytes B) et anti-BTK conjugués à des fluorochromes de couleur différente (par exemple, anti-CD19-cychrome et anti-BTK-PE), et d'évaluer par cytométrie en flux si les lymphocytes B ont proliféré et si l'expression de BTK est inhibée. Des lymphocytes B qui n'ont pas proliféré démontreront un seul pic de forte émission de fluorescence de CFSE, tandis que des lymphocytes B qui ont proliféré démontreront plusieurs pics de différentes concentrations de fluorescence de CFSE. De manière simultanée, il est possible d'évaluer le profil d'expression de la protéine tyrosine kinase BTK chez ces lymphocytes B isolés du receveur traité avec le FK778 seul ou en combinaison avec le tacrolimus, et d'en faire une comparaison avec les lymphocytes B d'un receveur témoin non traité. Cette nouvelle technique utilisant le fluorochrome CFSE est simple, efficace et très pertinente. De plus, on peut vérifier l'expression d'autres protéines de la signalisation intracellulaire (par exemple, NFAT, NF κ B, ERK, etc.). On s'attend à voir comme résultats que la prolifération des lymphocytes B isolés des receveurs traités avec la combinaison FK778-retardée sera beaucoup plus inhibée que chez les receveurs des autres groupes de traitements, et que l'expression de la protéine BTK en serait également plus inhibée. Si tel est le cas, notre hypothèse de départ serait vérifiée et prouvée, à savoir que la prolongation significative de la survie des allogreffes des receveurs traitées à la thérapie combinée FK778-retardée soit due à un effet immunosuppresseur synergique ciblant les lymphocytes B et la réponse humorale. Si tel n'est point le cas, alors on aurait lieu de croire que la prolongation de la survie des allogreffes traitées avec la thérapie FK778-retardée n'implique pas l'inhibition des lymphocytes T ou B, mais possiblement d'un autre type cellulaire du système immunitaire.

« Pourquoi la cyclosporine est-elle le seul immunosuppresseur conventionnel à produire des effets bénéfiques lorsque administrée de manière concomitante avec le rPSGL-Ig? » Nous avons démontré que la thérapie combinée du rPSGL-Ig et de la cyclosporine est bénéfique dans la prévention du rejet aigu d'allogreffe rénale chez le rat. Nos résultats vont dans le même sens que ceux de Kusaka et al. (1999), où les auteurs ont rapporté qu'une thérapie combinée du rPSGL-Ig et de faibles doses de cyclosporine permet de prolonger de manière indéfinie la survie des allogreffes rénales (>200 jours). Néanmoins, le groupe du Dr Tilney a utilisé une combinaison d'espèces semiallogénique (LBNF1 [RT1^{l/n}] → LEW [RT1^l]), et le protocole d'immunosuppression était différent et il consistait en une administration intraveineuse continue de rPSGL-Ig 50 µg/jour en combinaison avec un traitement à la cyclosporine s.c. 1.5 mg/kg/jour, pendant 10 jours. Dans notre étude, les rats receveurs d'allogreffe complètement allogénique (ACI [RT1^a] → LEW [RT1^l]) ne sont traités d'une seule thérapie intraveineuse de rPSGL-Ig 100 µg suivi d'un traitement à la cyclosporine p.o. 4 mg/kg/jour, pendant trois jours seulement. Il est alors compréhensible que dans notre modèle d'étude, les allogreffes traitées avec une combinaison de rPSGL-Ig et de cyclosporine ne survivent pas indéfiniment, comme l'ont rapporté Kusaka et al. (1999). Nous avons ensuite évalué la combinaison du rPSGL-Ig avec d'autres immunosuppresseurs connus. À notre grande déception, nous avons observé qu'il n'y a aucun avantage à combiner le rPSGL-Ig avec le sirolimus, tacrolimus ou mycophénolate mofétil (malgré que ces agents possèdent des mécanismes d'action différents au rPSGL-Ig), puisque la survie des allogreffes n'est point prolongée. Par contre, avant de proscrire quelque thérapie que ce soit, il serait approprié de vérifier à nouveau l'efficacité de ces combinaisons avec un protocole d'immunosuppression différent, soit une période de traitement plus longue. Il se peut qu'un traitement de trois jours avec de faibles doses d'immunosuppresseurs ne soit pas assez efficace à surmonter la vigoureuse réponse immune dans un modèle expérimental complètement allogénique. En effet, il a été rapporté que dans une combinaison d'espèce complètement allogénique

en transplantation rénale, les receveurs développent un rejet aigu fulminant et irréversible, voire qu'ils décèdent d'une urémie sévère durant la semaine qui suit la transplantation (Dragun et al., 2000; Nagano et al., 1997). En outre, il est à noter qu'il n'y a pas lieu de traiter les receveurs avec une administration continue de rPSGL-Ig, puisque sa demi-vie est de 100 ± 19 heures chez le rat, et que l'expression de la P-sélectine est un phénomène précoce dont l'intensité s'estompe après 48 heures (Dragun et al. 2000). Cependant, il serait intéressant de vérifier si une plus grande dose de rPSGL-Ig seul peut prolonger la survie des allogreffes. Nous avons tenté d'amener une explication quant au faible taux de succès avec la combinaison du rPSGL-Ig et du sirolimus, du tacrolimus ou du mycophénolate mofétil, et nous avons suggéré que cet échec puisse être directement relié à notre protocole d'immunosuppression trop bref associé à une combinaison d'espèces complètement allogénique. Néanmoins, un des résultats marquants de cette étude préliminaire est que la thérapie combinée du rPSGL-Ig et de la cyclosporine prolonge de manière significative la survie des allogreffes, malgré que la cyclosporine soit administrée sur une courte période de trois jours. Le nombre d'études qui rapportent que l'ischémie/reperfusion joue un important rôle dans le développement du rejet aigu d'allogreffe rénale ne cesse de s'accroître (Bohmova et al., 2001; Koo et al., 1998; Dragun et al., 2000). De nombreuses études expérimentales et cliniques démontrent que l'ischémie/reperfusion contribue au processus inflammatoire aigu qui implique une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion de surface. Or, plusieurs études ont démontré que le rPSGL-Ig protège contre les dommages causés par l'ischémie/reperfusion dans différents modèles d'isogreffes hépatiques, cardiaques, intestinales et rénales (Amersi et al., 2002; Hayward et al., 1999; Wang et al., 2002; Farmer et al., 2002; Fuller et al., 2001). Nous avons alors émis comme hypothèse que la combinaison d'une dose de rPSGL-Ig avec un immunosuppresseur conventionnel pourrait être une intéressante thérapie anti-rejet, puisque le rejet aigu est causé par des facteurs immunologiques (par exemple, l'histoincompatibilité) et des facteurs non-immunologiques (par exemple, l'ischémie/reperfusion). Or, les dommages causés par l'ischémie/reperfusion peuvent

être réduits par un traitement au rPSGL-Ig, et les réponses allogéniques reliées à l'histocompatibilité peuvent être contrées par un agent immunosuppresseur conventionnel. Avec satisfaction, c'est ce que nous avons observé avec la combinaison du rPSGL-Ig et de la cyclosporine. Par contre, les thérapies combinées du rPSGL-Ig avec le sirolimus, le tacrolimus ou le mycophénolate mofétil échouent de prolonger la survie des allogreffes rénales. Ceci nous a amenés à nous poser la question à savoir quelle propriété unique la cyclosporine possède-t-elle qui puisse être bénéfique pour prévenir contre le rejet aigu d'allogreffe? Ce n'est sans doute point sa capacité d'inhiber la calcineurine puisque le tacrolimus possède cette même caractéristique. Certains diront que la cyclosporine est tout simplement plus efficace que les autres immunosuppresseurs utilisés. Cependant, nos résultats démontrent que le sirolimus 0.8 mg/kg/jour (9.8 ± 2.1 jours) et le tacrolimus 1 mg/kg/jour (12.3 ± 5.0 jours) sont tout aussi efficaces que la cyclosporine 4 mg/kg/jour (9.5 ± 2.1 jours) pour prévenir contre le rejet aigu, voire même que le tacrolimus semble être un peu plus efficace que les autres agents. Cependant, cette différence n'est pas statistiquement significative. Une des caractéristiques uniques de la cyclosporine est sa capacité de réduire les dommages causés par l'ischémie/reperfusion en bloquant la transition de perméabilité mitochondriale. En effet, il a été démontré que la cyclosporine inhibe la transition de perméabilité mitochondriale en bloquant l'activité peptidyl-prolyl cis-trans isomérase de la cyclophiline-D et l'interaction de la cyclophiline-D avec l'adénine nucléotide translocase, une étape cruciale pour l'ouverture du pore mitochondrial (Halestrap et al., 1998; Clarke et al., 2002). Durant une ischémie/reperfusion, il y a une induction du stress oxydatif et une déplétion en ATP, deux facteurs qui favorisent l'ouverture du pore mitochondrial, et donc une transition de perméabilité mitochondriale. La transition de perméabilité mitochondriale a été démontrée à promouvoir la « nécrapoptose », un phénomène de mort cellulaire apoptotique ou nécrotique, caractéristique de la transition de perméabilité mitochondriale (Lemasters, 1999). Des études ont démontré que la cyclosporine agit comme un inhibiteur puissant de la transition de perméabilité mitochondriale, et aussi des dommages de

l'ischémie/reperfusion dans des modèles cardiaques, hépatiques et rénaux (Qian et al., 1997; Halestrap et al., 1997; McAnulty, 1998). Récemment, Daemen et al. (2002) ont rapporté que l'apoptose et l'inflammation sont les mécanismes centraux des dommages causés par l'ischémie/reperfusion suite à une transplantation rénale. En conséquence, il est attrayant de spéculer que l'effet bénéfique observé avec la thérapie combinée du rPSGL-Ig et de la cyclosporine, à prolonger la survie des allogreffes rénales, peut être relié à la synergie de ces deux agents à réduire les dommages de l'ischémie/reperfusion via deux mécanismes de protection différents: le rPSGL-Ig empêche l'infiltration leucocytaire dans l'allogreffe, tandis que la cyclosporine prévient la mort cellulaire nécrapoptique via le blocage de la transition de perméabilité mitochondriale, et elle réduit aussi l'accumulation des neutrophiles au niveau de l'allogreffe (en plus d'exercer ses effets immunosuppresseurs via l'inhibition de la calcineurine). En effet, il a été démontré que la cyclosporine et le tacrolimus réduisent les dommages de l'ischémie/reperfusion en empêchant l'accumulation de cellules polymorphonucléaires au site de l'allogreffe via différents mécanismes, par exemple l'inhibition de l'expression de l'ARN messenger codant pour le NF κ B, le blocage de la production du TNF α et l'induction de la protéine HSP-70 (Squadrito et al., 2000; Yang et al., 2001; Ishii et al., 1994). À l'inverse, on peut émettre l'hypothèse qu'il n'y a pas de synergie entre le rPSGL-Ig et le sirolimus, le tacrolimus ou le mycophénolate mofétil, puisque ces immunosuppresseurs ont été démontrés à inhiber l'ischémie/reperfusion en empêchant l'infiltration leucocytaire dans l'allogreffe, un mécanisme de protection similaire à celui du rPSGL-Ig (Valentin et al., 2000; Jain et al., 2001; Krishnadasan et al., 2002). Pour évaluer l'hypothèse voulant que la prolongation significative de la survie des allogreffes traitées avec la combinaison du rPSGL-Ig et de la cyclosporine soit due à une réduction synergique des dommages causés par l'ischémie/reperfusion, il serait pertinent de vérifier le niveau d'inflammation et d'apoptose dans ces allogreffes, puisque Daemen et al. (2002) ont démontré que les dommages causés par l'ischémie/reperfusion empruntent principalement ces deux mécanismes. Entre autres, il serait adéquat d'évaluer le taux d'infiltration des leucocytes (effet du rPSGL-Ig) ainsi que le niveau

d'apoptose et de nécrose (effet de la cyclosporine en tant qu'inhibiteur de la transition de perméabilité mitochondriale) dans l'allogreffe. En outre, il est important d'évaluer les marqueurs de l'inflammation comme les cellules et les cytokines proinflammatoires.

i) Évaluation des marqueurs de l'inflammation dans les allogreffes. A) L'empreinte digitale de la réponse inflammatoire demeure l'infiltration cellulaire. Pour évaluer le niveau d'infiltration cellulaire dans les allogreffes rénales, il suffit d'effectuer une histopathologie classique à l'éosine/hématoxyline des allogreffes avant qu'elles ne soient rejetées, c'est-à-dire à un temps précis, et de comparer les coupes histologiques des différents groupes de traitement. On s'attend à voir que les allogreffes traitées avec la combinaison rPSGL-Ig et cyclosporine démontre une plus faible intensité d'infiltration leucocytaire comparativement aux autres groupes de combinaison ou de monothérapie. B) Cependant, l'histopathologie classique ne renseigne pas sur les types cellulaires infiltrants. Pour identifier la présence de ces cellules proinflammatoires (par exemple, les lymphocytes T auxiliaires et cytotoxiques, et les macrophages) dans les allogreffes, il faudrait effectuer une immunohistochimie sur les coupes histologiques qui seront traitées avec des anticorps monoclonaux conjugués à un fluorochrome (par exemple, anti-CD4-FITC pour cibler les lymphocytes T auxiliaires), et évaluer ces coupes par microscopie à fluorescence. Si les résultats démontrent que les coupes histologiques des allogreffes traitées avec la combinaison du rPSGL-Ig et de la cyclosporine ont une plus faible infiltration de cellules CD4⁺ (lymphocytes auxiliaires), CD8⁺ (lymphocytes cytotoxiques) ou ED1⁺ (macrophages) que les allogreffes traitées au autres traitement de combinaison, cela prouverait que le taux d'inflammation, et possiblement les dommages de l'ischémie/reperfusion, est réduit avec une telle thérapie. C) De plus, il serait pertinent d'évaluer l'expression des ARN messagers codant pour des cytokines Th1 proinflammatoires (par exemple, l'IL-1, l'IL-2, l'IFN γ et le TNF- α) et des chimiokines (par exemple, RANTES et MCP-1) dans les allogreffes rénales, à l'aide de la technique quantitative de la reverse transcriptase de la réaction de polymérase en chaîne (RT-PCR) in situ ou par l'hybridation de l'ARN messager (Northern blot). En effet, Amersi et al. (2002) ont démontré qu'un traitement de rPSGL-

Ig module à la baisse l'expression des cytokines Th1 proinflammatoires (l'IL-2, l'IFN γ et le TNF- α), mais augmente l'expression de l'IL-4, une cytokine de type Th2 dans des allogreffes hépatiques de rat. Kusaka et al. (1999) ont également apporté qu'un traitement combiné de rPSGL-Ig et de cyclosporine permet de minimiser l'infiltration des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ ainsi que les macrophages dans l'allogreffe, et de réduire l'expression de l'ARN messager codant pour les cytokines proinflammatoires Th1 (l'IL-1 et le TNF- α) ainsi que la chimiokine MCP-1, qui a un effet chimiotactique sur les macrophages. En extrayant l'ARN des allogreffes et en utilisant la réaction de polymérase en chaîne utilisant la reverse transcriptase ou la technique du Northern blot, on peut évaluer et comparer l'expression de certaines cytokines ou chimiokines proinflammatoires. On s'attend à ce que les résultats soient en faveur de la thérapie combinée du rPSGL-Ig et de la cyclosporine, c'est-à-dire que les allogreffes traitées avec cette combinaison n'exprime pas ou peu IL-1, IL-2, IFN γ , TNF- α , RANTES et MCP-1, comparativement aux allogreffes traitées avec rPSGL-Ig en combinaison avec le tacrolimus, le sirolimus ou le mycophénolate mofétil. ii) Évaluation du niveau de nécrapoptose dans les allogreffes. A) Une méthode rapide et sensible pour évaluer le niveau d'apoptose in situ dans les allogreffes rénales demeure la technique du TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling) et l'évaluation par microscopie à fluorescence (Ito et al., 1995). Cette technique permet de détecter la fragmentation des brins d'ADN, phénomène typique de l'apoptose, sur les coupes histologiques des allogreffes. Les coupes histologiques sont d'abord incubées avec des nucléotides modifiés (par exemple, dUTP conjugués à une fluorescéine) utilisant une enzyme exogène comme la terminal déoxynucléotidyl transférase. Cette étape permet de détecter les bris des brins d'ADN en 3'OH. L'enzyme terminal déoxynucléotidyl transférase catalyse l'attachement des nucléotides dUTP conjugués à une fluorescéine dans les brins d'ADN en 3'OH. Ensuite, les coupes histologiques sont analysées par microscopie à fluorescence, où la fragmentation d'ADN est alors détectable. B) Cependant, la méthode la plus précise pour évaluer le niveau de mort cellulaire apoptotique et nécrotique demeure la technique de microscopie à fluorescence

évaluant les coupes histologiques des allogreffes rénales marquées avec les fluorochromes Hoechst 33342 et propidium iodide, puisqu'elle permet de détecter et de différencier les cellules en début d'apoptose (caractérisée par un rétrécissement cellulaire, une condensation nucléaire et une préservation de l'intégrité de la membrane cellulaire), en fin d'apoptose ou en phase de nécrose secondaire (caractérisée par une modification du noyau et la perte de l'intégrité de la membrane cellulaire) et en phase de nécrose primaire (caractérisée par un accroissement cellulaire, l'absence d'une condensation de la chromatine et une disruption de l'intégrité de la membrane cellulaire) (Raymond et al., 2003). Le fluorochrome Hoechst 33342 détecte la condensation de la chromatine (signe d'apoptose) en émettant une fluorescence de couleur bleue claire et le propidium iodide détecte la disruption de l'intégrité de la membrane cellulaire (signe de nécrose ou apoptose en phase tardive) en émettant une fluorescence de couleur rouge. Il est possible de différencier la nécrose et l'apoptose en phase tardive, en comparant la morphologie du noyau. On s'attend à voir moins d'apoptose et de nécrose (fluorescence bleue claire et rouge) et plus de cellules viables (fluorescence bleue foncée) chez les allogreffes traitées avec le rPSGL-Ig et la cyclosporine, comparativement avec les autres groupes de combinaison. Il faut, cependant, tenir compte d'une élégante étude *in vitro* menée par Raymond et al. (2003), où les auteurs démontrent que la cyclosporine inhibe l'apoptose des cellules endothéliales via l'inhibition de la transition de perméabilité mitochondriale, mais que la mort cellulaire est redirigée vers la nécrose. Si le taux d'apoptose et de nécrose des cellules parenchymateuses des allogreffes rénales traités avec le rPSGL-Ig et la cyclosporine est faible, alors on sera porté à croire que la prolongation significative de la survie d'allogreffe serait causé par l'effet bénéfique de la cyclosporine à inhiber les dommages de l'ischémie/reperfusion en minimisant le niveau de nécrapoptose via le blocage de la transition de perméabilité mitochondriale. Si tel n'est point le cas, alors on aurait lieu de croire que le phénomène d'inhibition de l'apoptose qu'engendre la cyclosporine en bloquant le pore de transition mitochondriale serait redirigé vers la mort cellulaire nécrotique. Ainsi, notre hypothèse de départ voulant que la propriété de

la cyclosporine à réduire des dommages de l'ischémie/reperfusion via l'inhibition de la transition de perméabilité mitochondriale serait infirmée.

En outre, pour évaluer si la propriété de la cyclosporine à réduire les dommages de l'ischémie/reperfusion via l'inhibition du potentiel membranaire soit l'ultime raison de l'effet synergique observé avec la combinaison du rPSGL-Ig et de la cyclosporine, il serait pertinent de vérifier si la triple thérapie combinée incluant le rPSGL-Ig, le tacrolimus et le NIM811, pourrait prolonger la survie des allogreffes avec la même intensité que la combinaison du rPSGL-Ig et de la cyclosporine. Le tacrolimus est un inhibiteur de la calcineurine et le NIM811 est un dérivé de la cyclosporine qui bloque le pore mitochondrial sans toutefois bloquer la calcineurine [Waldmeier et al., 2002]). En combinant ces deux agents avec le rPSGL-Ig, on peut alors vérifier si le fait de bloquer le pore mitochondrial permette de prolonger davantage la survie des allogreffes, en comparant avec le groupe traité avec la thérapie combinée du rPSGL-Ig et du tacrolimus (MST = 25.0 ± 29.4 jours). Si tel est le cas, on aurait lieu de croire que le blocage de la transition de perméabilité, possiblement via la réduction des dommages de l'ischémie/reperfusion, jouerait un rôle protecteur contre le rejet d'allogreffe, puisqu'une combinaison du rPSGL-Ig et du tacrolimus échoue de prolonger la survie d'allogreffe. Si un tel traitement ne permet pas de prolonger la survie des allogreffes rénales, alors on aurait tendance à croire que le blocage du pore mitochondrial n'est pas le mécanisme responsable de la prolongation de la survie des allogreffes rénales traitées avec la combinaison rPSGL-Ig et cyclosporine. Pour ce faire, il serait pertinent de vérifier s'il y a une corrélation entre la survie d'allogreffe et le niveau de mort cellulaire par apoptose et/ou par nécrose (par exemple, avec la méthode de microscopie à fluorescence évaluant les coupes histologiques des allogreffes rénales marquées avec les fluorochromes Hoechst 33342 et propidium iodide), ou une corrélation entre la survie d'allogreffe et le niveau de transition de perméabilité mitochondriale des cellules tubulaires traitées avec les différents traitements (par exemple, en mesurant le potentiel membranaire mitochondrial $\Delta\Psi_m$). La technique de microscopie à fluorescence utilisant

les fluorochromes 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide et propidium iodide demeure une bonne méthode pour évaluer le potentiel membranaire mitochondrial des cellules tubulaires traitées avec la combinaison du rPSGL-Ig et de la cyclosporine *versus* la combinaison du rPSGL-Ig, du tacrolimus et du NIM811 (Rottenberg et al., 1997; Raymond et al., 2003). Le 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide est un fluorochrome lipophile qui demeure piégé dans la mitochondrie lorsque le $\Delta\Psi_m$ est à un niveau normal. Une ouverture du pore mitochondrial, par exemple chez des cellules en apoptose, cause la perte de $\Delta\Psi_m$ et la libération intracellulaire du 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide. L'intensité de fluorescence est alors réduite. Une simple expérience pour évaluer le potentiel membranaire mitochondrial consiste à isoler les cellules tubulaires rénales de rat, les mettre en culture sous des conditions expérimentales normales, les exposer aux différents traitements (soit rPSGL-Ig + cyclosporine ou rPSGL-Ig + tacrolimus + NIM811), et les incuben en présence de 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide, pendant 20-30 minutes. Les cellules sont ensuite traitées avec le propidium iodide afin de détecter les cellules nécrotiques ou les cellules en phase d'apoptose tardive. Le 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide détecte la disruption de l'intégrité de la membrane cellulaire en émettant une fluorescence de couleur rouge. S'il y a une corrélation entre la survie d'allogreffe et le niveau de transition de perméabilité mitochondriale des cellules tubulaires traitées avec les différents traitements ($\Delta\Psi_m$), on aurait lieu de croire que la prolongation de la survie des allogreffes observée avec le traitement combiné du rPSGL-Ig et de la cyclosporine est due à la propriété de la cyclosporine à bloquer le potentiel membranaire mitochondrial, puisque les autres immunosuppresseurs ne possèdent pas cette propriété. Enfin, il serait intéressant d'évaluer la thérapie combinée du rPSGL-Ig, du NIM811 et du sirolimus à prévenir contre le rejet aigu puisque ce traitement n'inclut pas d'inhibiteur de la calcineurine, voire donc ne cause pas de néphrotoxicité.

En outre, nos expériences suscitent d'intéressants résultats inattendus. De prime abord, notre objectif principal était de découvrir de meilleures thérapies

immunosuppressives pour prévenir et traiter contre le rejet aigu d'allogreffes. Non seulement nous avons démontré que la plupart des thérapies combinées évaluées permettent de prolonger de manière synergique la survie des allogreffes vascularisées, nos résultats suggèrent aussi que certains protocoles d'immunosuppression expérimentaux peuvent être efficaces pour prévenir contre le rejet aigu à long terme, le rejet chronique et le rejet de xénogreffe puisqu'ils inhibent particulièrement la réponse humorale allogénique, et que la pathogenèse de ces types de rejet implique principalement les lymphocytes B et la production d'anticorps allospécifiques. En effet, la thérapie combinée du FK778 et du tacrolimus pourrait être bénéfique pour prévenir contre le rejet chronique et le rejet de xénogreffe, particulièrement lorsque le FK778 est administré de façon retardée. Autrefois, le problème majeur en transplantation d'organes était de surmonter le rejet aigu à court terme. Aujourd'hui, avec la découverte d'agents immunosuppresseurs puissants comme la cyclosporine ou le tacrolimus, le rejet à court terme ne représente plus un problème de grande envergure, mais ce sont plutôt le rejet aigu à long terme et le rejet chronique. Sur le plan clinique, ces observations précliniques sont très utiles puisque le taux de perte de greffon à long terme dû au rejet chronique demeure toujours à la hausse. Il serait intéressant d'évaluer l'efficacité de cette thérapie combinée à retarder l'initiation du rejet chronique dans des modèles de transplantation aortique allogénique. Outre la combinaison tacrolimus et FK778, les thérapies combinées incluant des agents anti-molécules d'adhésion, dont la combinaison du WAY-160279 et du sirolimus et l'association du rPSGL-Ig et de la cyclosporine, sont également très prometteurs pour prévenir contre le rejet chronique puisque les molécules d'adhésion ont été rapportées à jouer un rôle primordial dans les dommages causés par l'ischémie/reperfusion, et que ce phénomène non immunologique demeure un facteur de causalité du rejet chronique (Fuggle et al., 1998; Häyry, 1998). Les thérapies anti-molécules d'adhésion sont un sujet de l'heure en transplantation d'organes (Stepkowski, 2001; Fuggle et al., 1998). En effet, Räisänen-Sokolowski et al. (1999) ont démontré chez des souris génétiquement modifiées avec une délétion dans le gène de la P-sélectine que le développement du rejet chronique est

retardé et que l'athérosclérose est significativement réduite. De plus, la thérapie combinée du WAY-160279 et du sirolimus peut être un traitement très prometteur pour prévenir contre le rejet chronique. En effet, plusieurs études ont rapporté qu'un traitement anti-VLA-4 inhibe le rejet chronique, le développement d'athérosclérose, voire l'artériopathie d'allogreffe dans des modèles de transplantation cardiaque et rénale (Molossi et al., 1995; Zohlnhöfer et al., 1999; Demirci et al., 1999; Isobe et al., 1998). Également, il a été démontré que les protéines de la matrice extracellulaire (par exemple, la fibronectine) jouent un rôle important dans le développement du rejet chronique en transplantation d'organes (Coito et al., 2000; Demirci et al., 1999). Il est connu que la fibronectine est un ligand de la molécule d'adhésion VLA-4, et que cette interaction VLA-4-fibronectine cause la rétention des lymphocytes au site de l'inflammation. En outre, dans une élégante étude, Zohlnhöfer et al. (1999) ont rapporté que l'interaction entre les molécules d'adhésion VLA-4 et VCAM-1 induit l'activation du facteur NF κ B dans les monocytes et les cellules endothéliales, voire une augmentation de l'expression et la production d'IL-1 et d'IL-6, des cytokines jouant un rôle important dans les réactions inflammatoires observées dans l'athérosclérose. Kauppinen et al. (2000) ont également rapporté que les molécules d'adhésion VLA-1 et VCAM-1 jouent un rôle dans la phase d'induction du rejet chronique, et non durant la phase tardive. Tel que décrit dans la partie discussion du manuscrit I, le sirolimus est un agent immunosuppresseur prometteur avec des propriétés anti-rejet chronique. Il est donc légitime de croire que la combinaison du WAY-160279 et du sirolimus est une avenue thérapeutique intéressante pour la prévention contre le rejet chronique. Outre son potentiel thérapeutique pour prévenir contre le rejet chronique, il a été rapporté qu'une longue période (12-24 heures) d'ischémie froide dans la solution de préservation UW cause une augmentation significative de l'expression de VLA-4 sur les monocytes infiltrants et l'expression de VCAM-1 sur les cellules endothéliales. Ceci étant associé à un endommagement de l'endothélium (Dragun et al., 2001). Une thérapie au WAY-160279 peut être efficace pour prévenir contre les dommages causés par l'ischémie/reperfusion, voire elle serait indiquée pour le traitement des allogreffes

rénales de donneurs cadavériques qui sont exposées à une longue période d'ischémie froide. De plus, il est bien connu que le paramètre d'ischémie/reperfusion est un facteur non immunologique qui contribue au développement du rejet aigu et chronique. Enfin, l'utilisation de l'agent WAY-160279 en combinaison avec le tacrolimus pourrait être un traitement alternatif intéressant puisque cette thérapie combinée permettrait de prévenir contre le rejet aigu de manière synergique (compte tenu que ces deux agents possèdent des mécanismes d'action distincts) et l'effet néphroprotecteur de l'agent WAY-160279 pourrait réduire contre la néphrotoxicité induite par le tacrolimus, puisqu'il a été suggéré que la molécule VLA-4 joue un rôle dans l'initiation de certaines maladies rénales (Rabb et al., 1995). Cependant, certains diront qu'il est préférable d'éviter l'utilisation d'inhibiteurs de la calcineurine en raison de son profil néphrotoxique, hypertenseur et diabétogénique. Ceci demeure réaliste tant et aussi longtemps qu'on parvient à trouver un substitut plus efficace que le tacrolimus ou la cyclosporine. Certes, une tâche qui n'est guère commode. Outre le rejet chronique, un phénomène de plus en plus fréquemment observé en transplantation clinique demeure le rejet d'organes chez des patients présensibilisés. Ce type de rejet d'organe implique également la réponse humorale, et il est causé par la présence d'anticorps spécifiques contre le donneur chez le receveur. Les combinaisons FK778 et tacrolimus, mycophénolate mofétil et sirolimus, ainsi que rPSGL-Ig et sirolimus représentent donc un traitement immunosuppresseur préventif contre le rejet hyperaigu ou le rejet aigu tardif chez des patients présensibilisés.

En transplantation clinique, une autre préoccupation grandissante demeure les effets secondaires importants des agents utilisés en thérapie primaire tels les inhibiteurs de la calcineurine. En effet, le problème immédiat en transplantation clinique n'est plus de prévenir contre le rejet d'organe à court terme, mais plutôt de trouver de meilleures thérapies pour traiter contre le rejet d'organe à long terme, c'est-à-dire de prévenir contre le rejet aigu tardif et le rejet chronique, mais également d'éviter les effets secondaires des protocoles d'immunosuppression actuels. La cyclosporine et le

tacrolimus sont des immunosuppresseurs très efficaces mais inopportunément, ces agents comportent également beaucoup d'effets secondaires importants. Ceci est principalement dû à leur propriété à inhiber la calcineurine, un enzyme multifonctionnel impliqué dans plusieurs autres voies biochimiques et intracellulaires. Dans cette thèse de doctorat, nous avons exploré l'efficacité de deux traitements immunosuppresseurs exempts d'inhibiteurs de la calcineurine: les thérapies combinées sirolimus et mycophénolate mofétil et rPSGL-Ig et sirolimus. La combinaison du sirolimus et du mycophénolate mofétil demeure un traitement immunosuppresseur prometteur en clinique, puisqu'elle n'implique pas l'utilisation de la cyclosporine ou du tacrolimus, et qu'elle représente un protocole immunosuppresseur alternatif dans le but d'éviter les effets néphrotoxiques, hypertenseurs et diabétogéniques causés par ces agents chez les patients transplantés. Depuis la publication de ce manuscrit, plusieurs études cliniques ont rapporté l'efficacité de cette association à prévenir contre le rejet d'allogreffe chez des patients transplantés rénaux (Chang et al., 2000; Flechner et al., 2002; Kreis et al., 2000; Pescovitz et al., 2001). En outre, l'association du sirolimus et du mycophénolate mofétil représente un traitement immunosuppresseur prometteur contre le rejet chronique. Le mycophénolate mofétil a été démontré à prévenir contre les signes précoces dégénératifs du rejet chronique dans un modèle d'allogreffe rénale chez le rat (Azuma et al., 1995). D'autre part, plusieurs études rapportent que le sirolimus réduit significativement l'incidence du rejet chronique, voire les maladies vasculaires d'allogreffe dans des modèles de transplantation cardiaque et rénale (Schmid et al., 1995; Poston et al., 1999; Viklicky et al., 2000). Également, il a été démontré que la combinaison du mycophénolate mofétil et du sirolimus réduit significativement l'épaississement de l'intima dans un modèle d'angioplastie mécanique (Gregory et al., 1995). Récemment, notre équipe a rapporté que la thérapie combinée du sirolimus et du mycophénolate mofétil prévient significativement contre le rejet chronique dans un modèle d'allogreffe rénale chez le rat (Jolicœur et al., 2003). En effet, les receveurs traités avec la combinaison du sirolimus (20 mg/kg/jour) et du mycophénolate mofétil (0.8 mg/kg/jour) exprimaient un score de Banff significativement réduit de 4.21 ± 0.79 ,

comparativement aux groupes de monothérapie au sirolimus (7.27 ± 1.14) et au mycophénolate mofétil (6.31 ± 1.01) ($P < 0.001$). Néanmoins, il faudrait apporter une attention particulière aux propriétés du sirolimus et du mycophénolate mofétil à inhiber les cellules musculaires lisses puisqu'il a été récemment rapporté qu'une combinaison de sirolimus et de mycophénolate mofétil empêche de manière significative la réparation tissulaire dans un modèle de transplantation articulaire vascularisée chez le rat (Vogelin et al., 2002). Compte tenu que le patient receveur requiert une capacité adéquate de réparation tissulaire en période de postchirurgie, il serait sans doute plus sécuritaire d'attendre que ce dernier ait bien récupéré, voire qu'il soit dans une situation stable. Tel que mentionné ultérieurement, la combinaison du WAY-160279 et du sirolimus représente également une thérapie immunosuppressive encourageante pour la transplantation clinique. Non seulement le WAY-160279 et le sirolimus possèdent des propriétés individuelles qui protègent contre les dommages de l'ischémie/reperfusion et contre le rejet chronique, cette thérapie combinée n'inclut pas d'inhibiteurs de la calcineurine. Cette thérapie combinée, encore au stade préliminaire d'études précliniques, mérite d'être étudiée davantage dans des modèles de transplantation rénale ou aortique chez le primate non-humain. Enfin, un autre avantage à promouvoir un traitement immunosuppresseur sans agent inhibiteur de la calcineurine demeure la possibilité d'induire une tolérance à long terme chez le receveur. Effectivement, il a été rapporté que l'IL-2 est requis pour induire la tolérance (Li et al., 1998; Dai et al., 1998). Or, la cyclosporine et le tacrolimus inhibent tous deux la production d'IL-2, tandis que le sirolimus ne fait que bloquer le signal de l'IL-2 sans inhiber la transcription du gène de l'IL-2. Dai et al. (1998) ont d'ailleurs démontré qu'il est impossible d'induire une tolérance à long terme chez des souris déficientes du gène de l'IL-2.

Traitement immunosuppresseur de demain

Dans le présent projet de recherche de doctorat, nous avons examiné quatre nouvelles stratégies immunosuppressives dans le traitement du rejet aigu d'allogreffes vascularisées. Tel que mentionné, chacune d'elles possède des points prometteurs mais

aussi des aspects un peu moins attrayants. La thérapie immunosuppressive idéale semble utopique. Depuis les dernières années, la priorité en immunosuppression clinique est accordée à l'aspect sécuritaire des traitements immunosuppresseurs. Les pensées ont beaucoup changé depuis la découverte de la cyclosporine et des agents de nouvelle génération. Autrefois, la recherche était axée sur la découverte de nouvelles molécules ou thérapies d'anticorps puissantes, sans porter une attention particulière aux effets indésirables qu'elles pouvaient engendrer. Aujourd'hui, avec la disposition d'agents immunosuppresseurs efficaces, l'emphasis est fondamentalement axée sur l'élaboration de protocoles d'immunosuppression sécuritaires. Il est devenu primordial de considérer les infections opportunistes, les cancers, les maladies cardiovasculaires, et les toxicités spécifiques des agents. Dans l'avenir, il ne serait pas rare de voir que les traitements un peu moins efficaces mais exempts d'effets secondaires importants seront préférés aux protocoles d'immunosuppression actuels comportant trop de toxicités. Ces effets indésirables importants altèrent bien souvent la survie de l'allogreffe à long terme et celle du patient. Cela semble peut-être contradictoire, voire même farfelu, mais un greffon traité avec une thérapie moins efficace et dépourvue d'effets secondaires aurait peut-être plus de chance de survie que celui traité avec une thérapie très efficace mais causant d'importantes toxicités. Même si le rejet aigu est un facteur déterminant dans la survie du greffon, il semble que d'autres facteurs y jouent un rôle important. La plus grande faiblesse des agents immunosuppresseurs actuels demeure leur manque de sélectivité au niveau du mécanisme d'action. Il est donc primordial de privilégier la recherche de nouveaux traitements qui agiront de manière spécifique à inhiber les réponses immunes adaptatives, voire à éliminer les cellules immunitaires et les anticorps dirigés contre l'allogreffe, sans pour autant nuire aux mécanismes de défense innée nécessaires pour combattre les infections opportunistes et les cancers. Il est cependant peu probable que des molécules non biologiques possèdent cette propriété, puisque la majorité des agents à faible poids moléculaire sont reconnus pour agir sur des protéines multifonctionnelles hautement conservées. Avec le progrès considérable des technologies en biologie moléculaire, il est déjà possible de produire des agents

biologiques (par exemple, des anticorps monoclonaux, des protéines de fusion, des oligonucléotides, etc.) ciblant une molécule particulière. Néanmoins, l'ultime obstacle de tels traitements demeure leur faible fiabilité (faible constance dans le transport) et durabilité (faible potentiel d'utilisation à long terme chez le même patient). De plus, comme ces agents n'inhibent qu'une seule cible protéinique, et que le rejet aigu est une réponse immunitaire qui fait appel à différents mécanismes et plusieurs types cellulaires, il est peu probable qu'un traitement biologique seul ne sera assez efficace à prévenir contre le rejet aigu. Une combinaison avec d'autres immunosuppresseurs est donc nécessaire. Un autre aspect intéressant en immunosuppression demeure la notion de thérapie combinée. Puisque le rejet d'organe est un phénomène temporel, la thérapie immunosuppressive de demain est sans équivoque une combinaison, non seulement de différents agents, mais aussi de différentes catégories d'agents. De manière vulgarisée, le processus du rejet d'organe peut être divisé en trois grandes étapes chronologiques: 1) Étape 1: Ischémie, préservation et reperfusion; 2) Étape 2: Rejet aigu; et 3) Étape 3: Rejet aigu tardif et rejet chronique. Le traitement immunosuppresseur de demain pourrait comprendre des molécules non biologiques ou issues de protéines inhibant chacune des trois étapes du processus de rejet d'organe. Par exemple, un traitement donné en prétraitement ou durant les premiers jours posttransplantation pour inhiber les lésions de l'ischémie/reperfusion, suivi d'un autre agent ou traitement qui agit à l'étape 2 pour prévenir contre le rejet aigu et enfin, suivi d'un traitement qui va autant prévenir contre le rejet aigu que le rejet chronique. De plus, chaque étape peut être divisée en sous-étapes. Par exemple, nous savons que les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ jouent un rôle très important durant les premiers jours posttransplantation, mais pas les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ et les lymphocytes B (puisque'ils requièrent un temps d'activation, de prolifération et de différenciation). Il est alors légitime d'utiliser un agent ou une combinaison d'agents qui cible plutôt les lymphocytes T (par exemple, une thérapie d'induction anti-CD3), et ensuite opter pour un traitement qui va inhiber autant les mécanismes cellulaires que les réponses humorales. En transplantation d'organes, il est indéniable que la recherche sur les mécanismes de rejet aigu et

chronique, de tolérance, et d'ischémie/reperfusion est primordiale afin de pouvoir orienter les chercheurs et scientifiques à développer des nouvelles molécules immunosuppressives, voire guider les chirurgiens et cliniciens à élaborer les meilleures stratégies et protocoles d'immunosuppression avec les thérapies physiques et pharmaceutiques disponibles.

7.2 PERSPECTIVES EN TRANSPLANTATION

Rejet chronique: l'inévitable bête noire

En transplantation d'organes, le rejet aigu n'est point le seul obstacle à la réussite, voire à la survie à long terme de l'allogreffe. Le rejet chronique est un facteur inquiétant en transplantation, puisqu'il est la cause première de la perte du greffon durant les dix premières années après la transplantation (Jolicœur, 2001). Le rejet chronique est un processus complexe et multifactoriel. Il est bien connu qu'il existe plusieurs facteurs prédisposant au rejet chronique, et qu'ils sont classifiés comme étant des facteurs dépendant de l'antigène, des facteurs indépendant de l'antigène ou des facteurs infectieux (Häyry, 1998). Les facteurs dépendants de l'antigène incluent des épisodes répétitifs de rejet aigu, une immunosuppression insuffisante, la présence d'anticorps anti-HLA, l'histoincompatibilité et l'absence d'anticorps anti-idiotypiques. Les facteurs indépendants de l'alloantigène sont l'âge du donneur, l'état de l'organe et/ou du donneur, les dommages causés par l'ischémie/reperfusion, l'hyperlipidémie, la néphrotoxicité induite par les immunosuppresseurs et la taille incompatible du greffon entre le donneur et le receveur. En outre, il existe notamment une troisième classe de facteurs de risque au rejet chronique, la présence d'infection. En effet, l'infection au cytomégalo virus demeure le facteur infectieux le plus important qui associé au rejet chronique. Cependant, plusieurs évidences démontrent que certains facteurs infectieux et indépendants de l'antigène peuvent aussi contribuer au rejet chronique via le rejet aigu (Häyry, 1998). Or, il semble que le rejet aigu soit le facteur de risque le plus important au rejet chronique. La plupart des thérapies immunosuppressives actuelles ne possèdent pas la propriété de prévenir contre le rejet chronique. Les inhibiteurs de la calcineurine, malgré leur grande efficacité à contrer le rejet aigu, peuvent jouer un rôle dans le développement du rejet chronique en induisant la néphrotoxicité chez les patients. De nouvelles stratégies immunosuppressives se doivent d'être prises afin de pouvoir utiliser ces agents efficaces à bon escient. Dans l'avenir, la recherche sur les mécanismes de pathogenèse du rejet chronique et sur les nouvelles thérapies

immunosuppressives ciblant le rejet chronique sera une grande préoccupation des chercheurs, scientifiques, chirurgiens et cliniciens travaillant dans le domaine de la transplantation d'organes.

Tolérance: l'ultime solution à la perte d'allogreffe

La tolérance immunologique est définie comme étant l'acceptation d'une allogreffe d'un donneur subséquent chez un receveur qui possède toujours la capacité de rejeter une allogreffe d'une tierce personne (Li et al., 2001). La tolérance est sans équivoque un des buts ultimes des chercheurs et cliniciens dans le domaine de la transplantation d'organes. Malgré l'avancement considérable dans le domaine de l'immunologie de la transplantation et l'immunosuppression clinique, les protocoles d'immunosuppression actuels ne sont pas toujours efficaces contre le rejet aigu et le rejet chronique et pour la plupart, ils n'induisent pas la tolérance à l'allogreffe. En effet, la survie moyenne d'allogreffe à long terme ne s'est point améliorée depuis le début des années 1970. Comme le facteur épidémiologique le plus important du rejet chronique est le rejet aigu, on peut supposer que l'incidence du rejet chronique soit minimisée chez les patients ayant une tolérance à l'allogreffe. De plus, les agents immunosuppresseurs actuels utilisés à long terme causent des effets indésirables importants pouvant même menacer la survie du patient, tels les infections opportunistes, les cancers et les désordres métaboliques et physiologiques. Ainsi, l'induction d'une tolérance à l'allogreffe, c'est-à-dire une acceptation permanente du greffon sans avoir recourt à une immunosuppression, demeure un objectif ultime en transplantation clinique. Bien décrit dans des manuels de transplantation, la tolérance est un processus activement acquis et hautement régulé (Li et al., 2001). Malgré que les mécanismes précis de la tolérance à l'allogreffe ne soient pas solidement définis, il est cependant clairement établi que la tolérance à l'allogreffe est un processus multifactoriel impliquant de nombreuses composantes cellulaires qui évoluent à travers le temps et qui jouent un rôle dans l'induction et le maintien de la tolérance (Li et al., 2001). Des recherches approfondies demeurent primordiales afin de mieux comprendre les

mécanismes sous-jacents du phénomène de tolérance puisque la tolérance à l'allogreffe représente la pièce manquante du casse-tête; un casse-tête grandiose évoquant aux yeux des chercheurs et transplantologues le sommet du Mont Everest.

Solutions à la pénurie d'organes

En transplantation clinique, un des plus grands problèmes que fait face la société est le manque d'organes disponibles à la transplantation. Depuis plus de 30 ans, le succès grandissant de la transplantation d'organes a fait de cette procédure thérapeutique une pratique clinique de routine. Aux États-Unis seulement, il s'est effectué plus de 18 674 transplantations au cours de l'année 2002 (UNOS, 2003). Néanmoins, en date du 15 janvier 2003, la liste d'attente pour l'obtention d'une transplantation d'organes s'estime à un nombre exubérant: 86 129 patients défaillants sont en attente d'un nouvel organe qui leur procurera un espoir de vie. Malgré l'amélioration exceptionnelle dans le domaine de la transplantation et de l'immunosuppression, la demande de donneurs d'organes s'accroît de manière drastique comparativement à l'offre, et la différence ne fait qu'augmenter d'année en année. En outre, un nombre significatif de patients meurent durant l'attente d'une transplantation. La recherche d'organes disponibles pour la transplantation est donc plus que jamais nécessaire. Puisque la transplantation d'organes est issue d'une pensée fort révolutionnaire, digne d'une imagination à saveur de « *Leonardo Da Vinci* », les solutions suggérées sont toutes aussi futuristes.

Xénotransplantation: quand le porc devient le meilleur ami de l'Homme. En clinique, la xénotransplantation consiste à transplanter un organe d'un animal chez l'humain. L'objectif de la xénotransplantation est de procurer aux humains des organes de manière presque indéfinie. Ce concept avant-gardiste ne date d'hier. Il a été rapporté que plusieurs transplantations xénogéniques furent effectuées chez l'humain durant la période de 1900 à 1920, mais que l'intensité du rejet d'organe était si vigoureuse que la population médicale et scientifique a préféré abandonner la pratique (Hancock, 2000).

L'intérêt pour la xénotransplantation a repris de plus bel vers les années 50, avec la découverte de nouveaux agents immunosuppresseurs comme l'azathioprine et le 6-mercaptopurine, et la réussite de la première transplantation rénale syngénique effectuée par le Dr Joseph Murray et le Dr David Hume, en 1954. Cependant, les tentatives de xénotransplantation furent plus que décevantes, et l'intérêt de transplanter un organe animal chez l'humain a grandement diminué avec l'arrivée de la technologie d'hémodialyse et la transplantation cadavérique. Au début des années 80, avec l'introduction de la cyclosporine en clinique, la recherche en xénotransplantation a repris son essor. En effet, en 1984, à l'Université Loma Linda en Californie, la petite Baby Fae reçut un cœur de babouin et vit pendant plus de 20 jours sous traitement à la cyclosporine. Depuis, la recherche en xénotransplantation demeure très active et plusieurs mécanismes du rejet de xénogreffe ont été identifiés, incluant le rejet hyperaigu, le rejet vasculaire aigu et le rejet cellulaire xénogénique. Avec les technologies d'aujourd'hui, il est également possible de produire des porcs transgéniques qui expriment des molécules humaines particulières, réduisant ainsi la xénogénicité de l'allogreffe voire l'intensité du rejet hyperaigu. Cependant, un moratoire temporaire a été ordonné mondialement sur les recherches cliniques en xénotransplantation, puisque les risques de zoonoses et xénoses sont existants. La recherche en xénotransplantation au niveau préclinique demeure cependant toujours très active, utilisant des porcs transgéniques comme donneurs et des primates non humains comme receveurs.

Cryopréservation. La cryopréservation est une autre solution futuriste à la pénurie d'organes disponibles à la transplantation. L'objectif de la cryopréservation est de congeler des organes cadavériques et les entreposer ensuite dans une banque d'organes disponibles pour la transplantation. Cette procédure comprend divers avantages tels la connaissance de l'histocompatibilité du donneur longtemps avant la transplantation; la diminution du gaspillage d'organes faute de receveur compatible, le choix du meilleur receveur selon l'histocompatibilité, réduisant ainsi l'immunogénicité

de l'allogreffe et augmentant les chances de survie d'allogreffe; etc.. La technique de cryopréservation consiste à congeler un organe de manière rapide, à des températures allant jusqu'à -196°C , utilisant des solutions de préservation particulières pour éviter le phénomène de vitrification (formation de cristaux de glace dans les cavités de l'organe) et à dégeler l'organe uniformément selon des étapes et procédures précises. Un problème majeur en cryopréservation est la difficulté à cryopréserver de manière appropriée des organes vascularisés pourvus de cavités, comme le rein et le cœur. Il semble que la cryopréservation des tissus et des organes sans cavités, comme l'ovaire, soit plus facile à réaliser, puisque le phénomène de vitrification est minimisé. Récemment, notre groupe de recherche, en collaboration avec deux autres équipes, a démontré que des rattes ovariectomisées et transplantées avec des ovaires cryopréservés pouvaient produire des hormones sexuelles et donner naissance à une progéniture normale (Xiang et al., 2002).

Organogenèse. De loin, la solution la plus spectaculaire et révolutionnaire au manque d'organes, voire digne de la science-fiction, c'est l'organogenèse. Le but de cette méthode plus qu'avant-gardiste est de produire des organes et des tissus histocompatibles. Avec le développement considérable des technologies et la connaissance de l'embryogenèse, il est maintenant possible de créer par des méthodes d'ingénierie biomédicale des tissus provenant des cellules cardiaques, musculaires et rénales clonées des fibroblastes de bœufs adultes. En effet, une élégante étude menée par Lanza et al. (2002) rapporte qu'il est possible de créer des tissus musculaires squelettiques et cardiaques. De plus, avec la méthode de transplantation nucléaire (clonage thérapeutique), le groupe a réussi à générer des unités fonctionnelles de rein capables de produire et de sécréter de manière unidirectionnelle des fluides semblables à l'urine, et démontrant des concentrations d'urée et de créatinine. Ces unités fonctionnelles possèdent des structures organisées semblables à des glomérules et des tubules. De plus, l'injection des cellules rénales clonées chez l'animal donneur de fibroblastes ne provoque aucune réponse d'hypersensibilité de type retardée. La

possibilité de générer des cellules histocompatibles utilisant des techniques de clonage demeure une avenue thérapeutique très prometteuse en transplantation clinique.

Don d'organes et de tissus: portez-vous le ruban vert? En attendant que les solutions révolutionnaires citées ultérieurement deviennent un jour une réalité clinique, la population générale n'est point sans défense et elle possède la capacité de remédier en partie au problème de pénurie d'organes disponibles pour la transplantation. Et ce, simplement en signant l'endos de leur carte d'assurance-maladie ou en faisant un don d'organes (rein ou foie partiel) ou de tissus à un proche parent ou un ami dans le besoin. *« Une population générale hautement sensibilisée combinée à l'avancement de la recherche en xénotransplantation, cryopréservation ou organogenèse est peut-être la solution idéale à la pénurie d'organes ».*

7.3 IMPLICATION DU PROJET DE RECHERCHE DE DOCTORAT DANS L'AVANCEMENT DE LA MÉDECINE ET DES SCIENCES

La transplantation d'organes est une intervention médicale primordiale chez des patients en défaillance d'organes vitaux. Tel que rapportent les organismes mondiaux comme Québec-Transplant, CAT, UNOS, le nombre de patients nécessitant une transplantation et le nombre de transplantations effectuées ne cessent d'augmenter chaque année. À l'échelle mondiale, la conséquence est que le nombre de patients transplantés devant prendre une médication immunosuppressive sera vraisemblablement toujours à la hausse. Compte tenu que les traitements immunosuppresseurs actuellement utilisés en clinique comportent des effets secondaires importants (néphrotoxicité, désordres cardiovasculaires, désordres métaboliques, infections opportunistes et cancers, etc.), la recherche préclinique de nouveaux agents immunosuppresseurs et stratégies immunosuppressives est d'une nécessité absolue en transplantation puisqu'elle permet l'élaboration éventuelle de meilleurs protocoles d'immunosuppression en clinique.

Ce projet de recherche de doctorat intitulé « Nouvelles thérapies immunosuppressives dans la prévention et le traitement du rejet aigu d'allogreffes vascularisées chez le rat » rapporte l'évaluation *in vitro* et *in vivo* de l'efficacité de quatre différentes thérapies combinées d'agents immunosuppresseurs incluant de nouvelles molécules immunosuppressives qui sont pour la plupart encore au stade expérimental: i) la combinaison du sirolimus et du mycophénolate mofétil; ii) la thérapie combinée du malononitrilamide FK778 et du tacrolimus; iii) l'association du WAY-160279, un antagoniste de VLA-4, et du sirolimus; et iv) le traitement combiné du rPSGL-Ig et d'un agent immunosuppresseur conventionnel (sirolimus, tacrolimus, mycophénolate mofétil et cyclosporine). Les résultats de ce projet de recherche sont intéressants et prometteurs puisqu'ils rapportent l'efficacité de nouvelles molécules avec des propriétés immunosuppressives et immunomodulatrices pouvant être utilisées en

association avec des agents immunosuppresseurs actuellement utilisés en clinique. Une telle association de faibles doses d'agents constitue une stratégie permettant d'obtenir une efficacité égale ou supérieure, tout en minimisant les effets secondaires dose-dépendants de chaque agent. Nous avons démontré qu'à des doses sous-thérapeutiques d'agents, la combinaison du sirolimus et du mycophénolate mofétil, la thérapie combinée du malononitrilamide FK778 et du tacrolimus, l'association du WAY-160279 et du sirolimus, et le traitement combiné du rPSGL-Ig et de la cyclosporine permettent de prolonger la survie d'allogreffes vascularisées chez le rat, sans toutefois causer des effets secondaires importants. Ces résultats précliniques *in vitro* et chez les rongeurs ont un impact important en médecine et en sciences puisqu'ils permettent de passer à la prochaine étape, c'est à dire l'évaluation de ces nouvelles thérapies immunosuppressives chez les primates non humains et éventuellement chez l'Homme. De plus, deux nouvelles thérapies combinées évaluées n'incluent pas d'inhibiteurs de la calcineurine. En transplantation clinique, la tendance est de réduire les doses des inhibiteurs de la calcineurine dans la mesure du possible, voire même éliminer leur utilisation puisqu'ils causent des effets secondaires et toxicités importants. Dans ce projet de recherche, nous avons démontré que l'utilisation de protocoles d'immunosuppression exempt d'inhibiteurs de la calcineurine tels l'association du sirolimus et du mycophénolate mofétil et la combinaison du WAY-160279 et du sirolimus semble efficace à prévenir contre le rejet d'allogreffe tout en étant sécuritaire. Ces résultats préliminaires permettront de promouvoir de nouvelles stratégies immunosuppressives moins conventionnelles en clinique. Enfin, les résultats de ce projet de recherche rapportent l'effet bénéfique de différents traitements immunosuppresseurs dans la prévention du rejet aigu tout en étant avantageux contre le rejet chronique. Nous avons démontré que la thérapie combinée du malononitrilamide FK778 et du tacrolimus permet d'inhiber la réponse humorale dans le rejet d'allogreffe. Un tel traitement immunosuppresseur demeure prometteur contre le rejet chronique, le rejet de xénogreffe, et le rejet aigu tardif chez des patients présensibilisés puisque l'immunité humorale joue un rôle principal dans la pathogenèse

de ces types de rejet. De plus, l'association du sirolimus et du mycophénolate mofétil semble tout aussi profitable à inhiber l'incidence du rejet chronique puisque ces deux agents possèdent des propriétés antiprolifératrices sur les cellules musculaires lisses. Enfin, l'utilisation de thérapies anti-molécules d'adhésion est également très bénéfique pour prévenir contre l'incidence du rejet chronique. L'association du WAY-160279 et du sirolimus et la combinaison du rPSGL-Ig et de la cyclosporine constituent des traitements immunosuppresseurs permettent de prolonger la survie des allogreffes vascularisées tout en permettant de prévenir contre les dommages de l'ischémie/reperfusion et le rejet chronique. Puisque le rejet chronique est un phénomène inévitable en transplantation d'organes, la découverte de nouvelles thérapies immunosuppressives efficaces contre le rejet aigu permettant à la fois de réduire l'incidence du rejet chronique constitue un impact important en médecine.

FIGURE 7.1.1. Mécanismes d'action des agents immunosuppresseurs étudiés

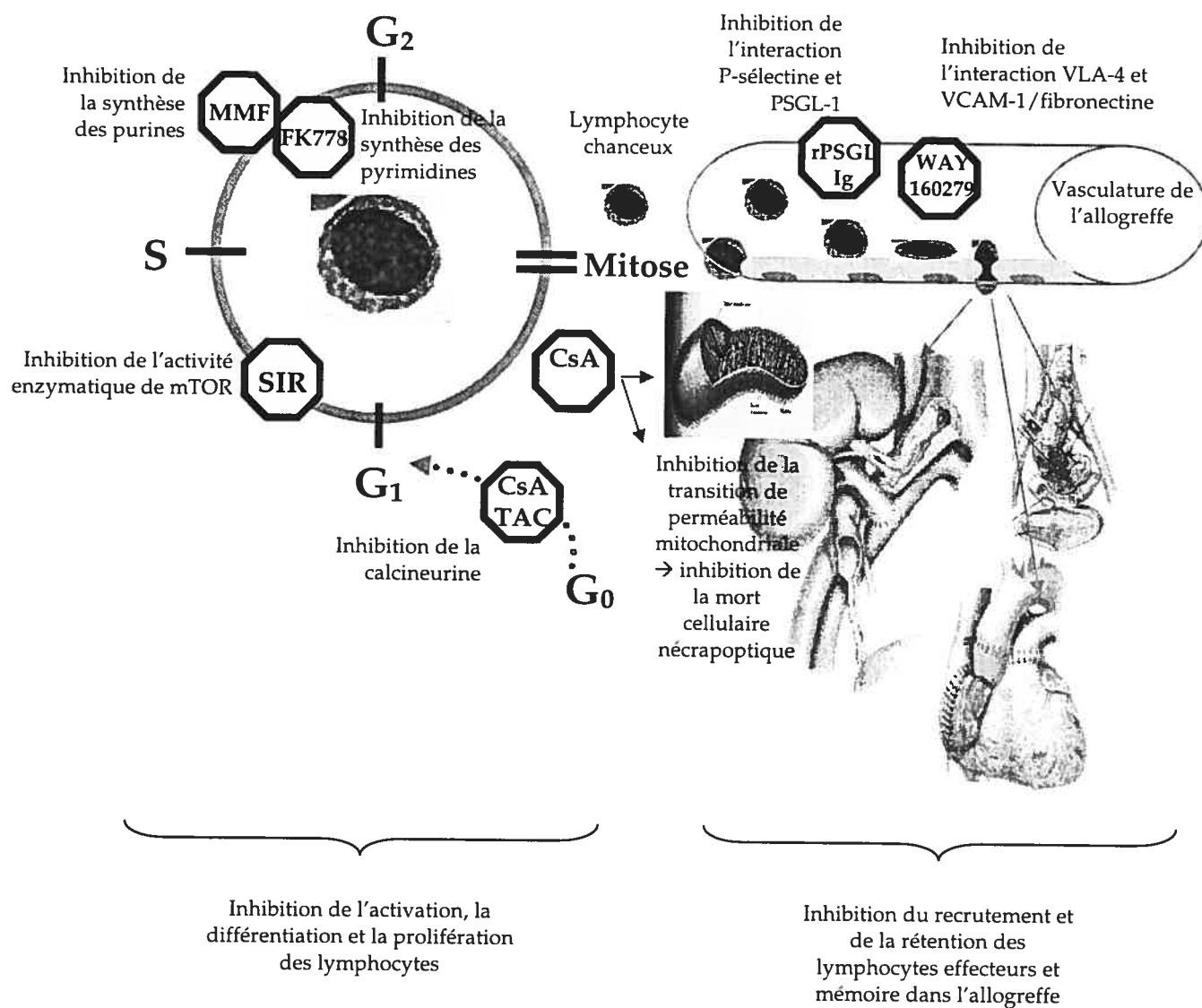
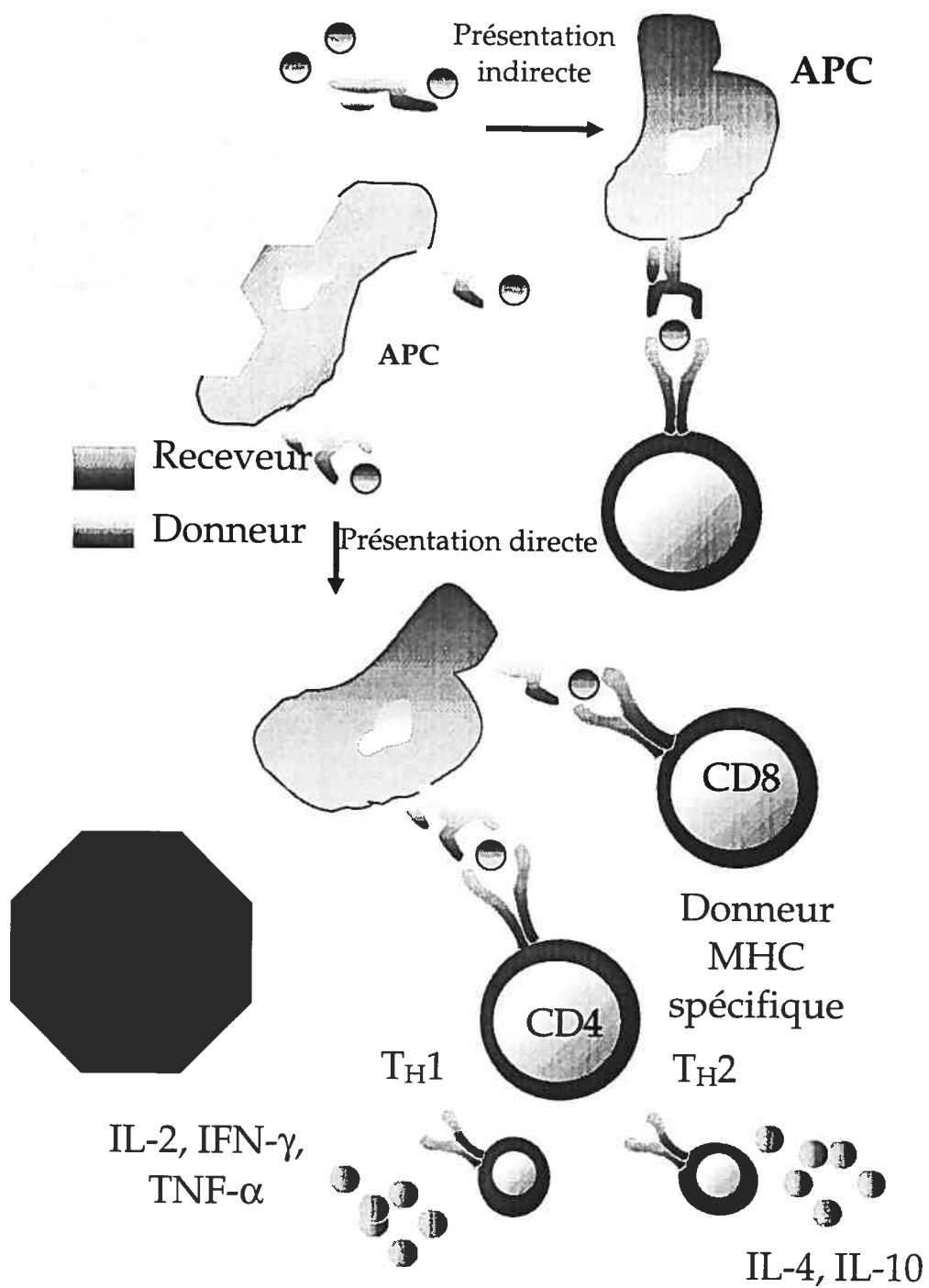
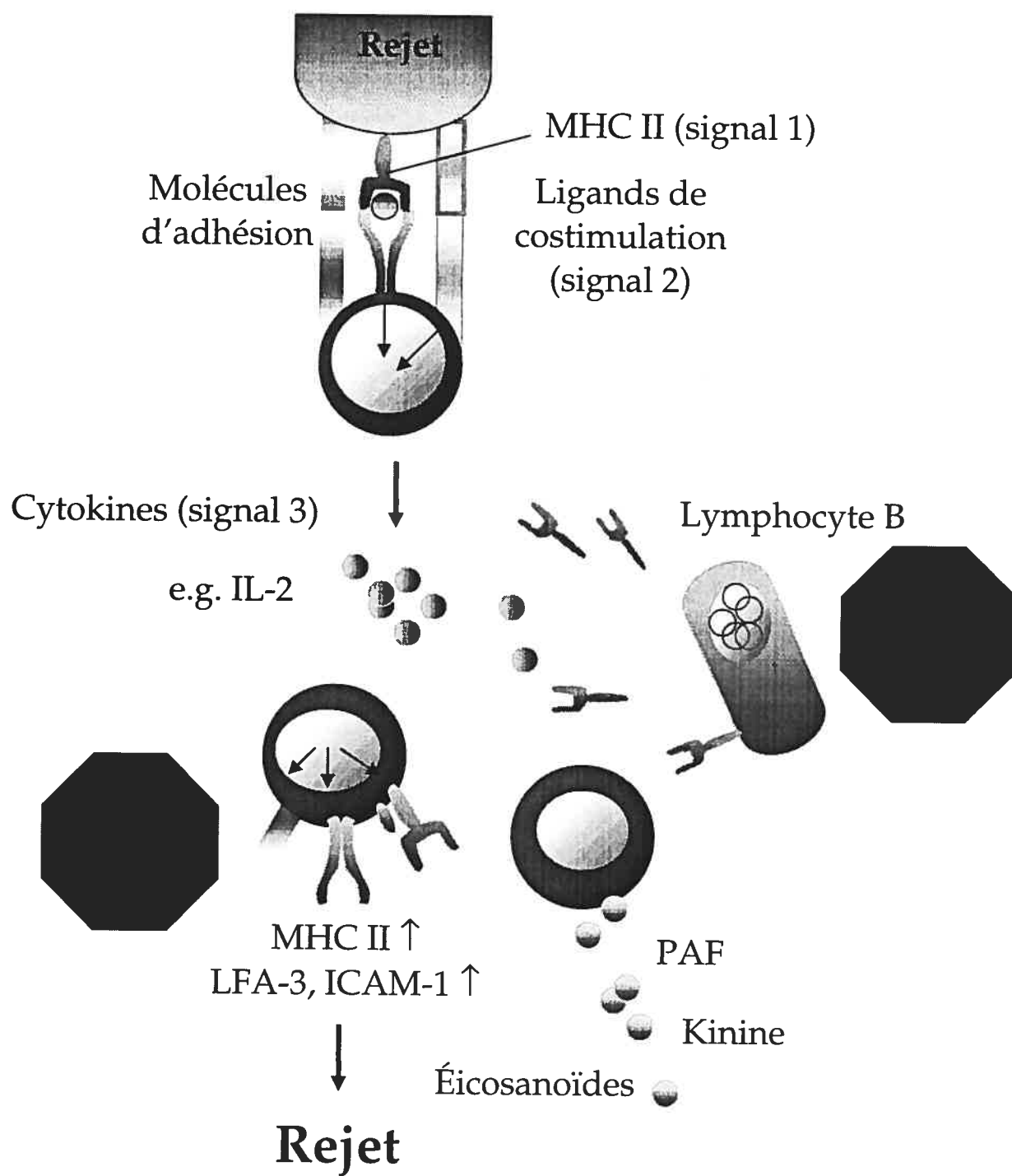


FIGURE 7.1.2. Phase précoce du rejet aigu



Modifié de Burmester et al., 2000.

FIGURE 7.1.3. Phase centrale du rejet aigu



Modifié de Burmester et al., 2000.

CHAPITRE VIII

SOURCES DOCUMENTAIRES

Aagaard-Tillery KM, Jelinek D. Inhibition of human B lymphocyte cell cycle progression and differentiation by rapamycin. *Cell Immunol* 1994; 156: 493-507.

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. Fourth Edition, WB Saunders, 2000.

Abouljoud MS, Kumar MS, Brayman KL, Emre S, Bynon JS; OLN-452 Study Group. Neoral rescue therapy in transplant patients with intolerance to tacrolimus. *Clin Transplant* 2002; 16 (3): 168-72.

Agrawal BB, Goldstein IJ. Physical and chemical characterization of concanavalin A, the hemagglutinin from jack bean (*Canavalia ensiformis*). *Biochim Biophys Acta* 1967; 133 (2): 376-9.

Ahsan N, Holman MJ, Katz DA, Abendroth CS, Yang HC. Successful reversal of acute vascular rejection in a renal allograft with combined mycophenolate mofetil and tacrolimus as primary immunotherapy. *Clin Transplantation* 1997; 11: 94-7.

Ahsan N, Hricik D, Matas A, Rose S, Tomlanovich S, Wilkinson A, Ewell M, McIntosh M, Stablein D, Hodge E. Prednisone withdrawal in kidney transplant recipients on cyclosporine and mycophenolate mofetil--a prospective randomized study. Steroid Withdrawal Study Group. *Transplantation* 1999; 68 (12): 1865-74.

Akalin E, Hendrix RC, Polavarapu RG, Pearson TC, Neylan JF, Larsen CP, Lakkis FG. Gene expression analysis in human renal allograft biopsy samples using high-density oligoarray technology. *Transplantation* 2001; 72 (5): 948-953.

Akizuki E, Akaike T, Okamoto S, Fujii S, Yamaguchi Y, Ogawa M, Maeda H. Role of nitric oxide and superoxide in acute cardiac allograft rejection in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 225 (2): 151-9.

Al Khursany I, Thomas TH, Harrison K, Wilkinson R. Reduced erythrocyte and leukocyte magnesium is associated with cyclosporin treatment and hypertension in renal transplant patients. *Nephrol Dial Transplant* 1992; 7: 251-255.

Albrechtsen D, Flatmark A, Jervell J, Halvorsen S, Solheim BG, Thorsby E. Significance of HLA-D/DR matching in renal transplantation. *Lancet* 1978; 2 (8100): 1126-7.

Aleksic I, Baryalei M, Busch T, Pieske B, Schorn B, Strauch J, Sirbu H, Dalichau H. Improvement of impaired renal function in heart transplant recipients treated with mycophenolate mofetil and low-dose cyclosporine. *Transplantation* 2000; 69 (8): 1586-90.

Aleman V, Handler P. Dihydroorotate dehydrogenase. I. General properties. *Biol Chem* 1967; 242 (18): 4087-96.

Alexandre GPJ, Latinne D, Gianello P, Squifflet JP. Preformed cytotoxic antibodies and ABO-incompatible grafts. *Clin Transplantation* 1991; 5: 583-94.

Allen RD, Nankivell BJ, Hawthorne WJ, O'Connell PJ, Chapman JR. Pancreas and islet transplantation: an unfinished journey. *Transplant Proc* 2001; 33 (7-8): 3485-8.

Allison AC, Eugui EM. Immunosuppressive and long-acting anti-inflammatory activity of mycophenolic acid and derivative, RS-61443. *Br J Rheumatol* 1991; 30 Suppl 2: 57-61.

Allison AC, Eugui EM. Purine metabolism and immunosuppressive effects of mycophenolate mofetil (MMF). *Clinical Transplantation* 1996; 10: 77-84.

Allison AC, Hovi T, Watts RW, Webster AD. Immunological observations on patients with Lesch-Nyhan syndrome, and on the role of de-novo purine synthesis in lymphocyte transformation. *Lancet* 1975; 2 (7946): 1179-83.

Almond PS, Moss A, Nakhleh RE, Melin M, Chen S, Salazar A, Shirabe K, Matas AJ. Rapamycin: immunosuppression, hyporesponsiveness, and side effects in a porcine renal allograft model. *Transplantation* 1993; 56 (2): 275-81.

Almond PS, Moss A, Nakhleh RE, Melin M, Chen S, Salazar A, Shirabe K, Matas AJ. Rapamycin: immunosuppression, hyporesponsiveness, and side effects in a porcine renal allograft model. *Transplantation* 1993; 56 (2): 275-81.

Amersi F, Farmer DG, Shaw GD, Kato H, Coito AJ, Kaldas F, Zhao D, Lassman CR, Melinek J, Ma J, Volk HD, Kupiec-Weglinski JW, Busuttil RW. P-selectin glycoprotein ligand-1 (rPSGL-Ig)-mediated blockade of CD62 selectin molecules protects rat steatotic liver grafts from ischemia/reperfusion injury. *Am J Transplant* 2002; 2(7): 600-8.

Ando K, Suzuki S, Tamura G, Arima K. Antiviral activity of mycophenolic acid. Studies on antiviral and antitumor antibiotics. IV. *J Antibiot (Tokyo)* 1968; 21 (11): 649-52.

Andoh TF, Burrdmann EA, Fransechini N, Houghton DC, Bennett WM. Comparison of acute rapamycin nephrotoxicity with cyclosporine and FK506. *Kidney Int* 1996; 50: 1110-7.

Andoh TF, Lindsley J, Franceschini N, Bennett WM. Synergistic effects of cyclosporine and rapamycin in a chronic nephrotoxicity model. *Transplantation* 1996; 62 (3): 311-6.

Anselmo DM, Amersi FF, Shen XD, Gao F, Katori M, Lassman C, Ke B, Coito AJ, Ma J, Brinkmann V, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW, Farmer DG. FTY720 pretreatment reduces warm hepatic ischemia reperfusion injury through inhibition of T-lymphocyte infiltration. *Am J Transplant* 2002; 2 (9): 843-9.

Antoniou E, DeRoover A, Nishimura Y, Howie AJ, McMaster P, D'Silva M. Effect of RS61443 in combination with leflunomide or FK506 on rat heart allograft survival. *Transpl Int* 1996; 9 Suppl 1: S331-3.

Arai K, Hotokebuchi T, Miyahara H, Arita C, Mohtai M, Sugioka Y, Kaibara N. Limb allografts in rats immunosuppressed with FK506. I. Reversal of rejection and indefinite survival. *Transplantation* 1989; 48 (5): 782-6.

Arakelov A, Lakkis FG. The alloimmune response and effector mechanisms of allograft rejection. *Semin Nephrol* 2000; 20 (2): 95-102.

Asa D, Raycroft L, Ma L, Aeed PA, Kaytes PS, Elhammer AP, Geng JG. The P-selectin glycoprotein ligand functions as a common human leukocyte ligand for P- and E-selectins. *J Biol Chem* 1995; 270 (19): 11662-70.

Astaldi G, Airo R. Phytohaemagglutinin and human lymphocytes in short-term tissue culture. *Boll Ist Sieroter Milan* 1966; 45 (5-6): 298-308.

Auchincloss H Jr, Lee R, Shea S, Markowitz JS, Grusby MJ, Glimcher LH. The role of

"indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90 (8): 3373-7.

Azuma H, Binder J, Heemann U, Schmid C, Tullius SG, Tilney NL. Effects of RS61443 on functional and morphological changes in chronically rejecting rat kidney allografts. *Transplantation* 1995; 59 (4): 460-6.

Bach FH, Amos DB. Hu-1: Major histocompatibility locus in man. *Science* 1967; 156 (781): 1506-8.

Baid S, Saidman SL, Tolckoff-Rubin N, Williams WW, Delmonico FL, Cosimi AB, Pascual M. Managing the highly sensitized transplant recipient and B cell tolerance. *Curr Opin Immunol* 2001; 13 (5): 577-81.

Baker H, Sidorowicz A, Sehgal SN, Vezina C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. III. In vitro and in vivo evaluation. *J Antibiot (Tokyo)* 1978; 31 (6): 539-45.

Baker RJ, Hernandez-Fuentes MP, Brookes PA, Chaudhry AN, Lechler RI. The role of the allograft in the induction of donor-specific T cell hyporesponsiveness. *Transplantation* 2001; 72 (3): 480-5.

Bartlett RR, Schleyerbach R. Immunopharmacological profile of a novel isoxazol derivative, HWA 486, with potential antirheumatic activity--I. Disease modifying action on adjuvant arthritis of the rat. *Int J Immunopharmacol* 1985; 7 (1): 7-18.

Bastien E, Holter A, Garrick T, Elkins W, Stuart F. Role of passenger leukocytes in the rejection of renal allografts. *Surg Forum* 1970; 21: 256-8.

Bechstein WO, Schilling M, Steele DM, Hullett DA, Sollinger HW. RS-

61443/cyclosporine combination therapy prolongs canine liver allograft survival. *Transplant Proc* 1993; 25 (1 Pt 1): 702-3.

Benhaim P, Antony JP, Ferreira L, Borsanyi JP, Mathes SJ. Use of combination of low-dose cyclosporine and RS-61443 in a rat hind limb model of composite tissue allotransplantation. *Transplantation* 1996; 61 (4): 527-32.

Benichou G. Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection. *Front Biosci* 1999; 4: D476-80.

Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 1998; 393 (6684): 478-80.

Bennett WM, Pulliam JP. Cyclosporine nephrotoxicity. *Ann Intern Med* 1983; 99 (6): 851-4.

Ben-Nun A, Lando Z, Dorf ME, Burakoff SJ. Analysis of cross-reactive antigen-specific T cell clones. Specific recognition of two major histocompatibility complex (MHC) and two non-MHC antigens by a single clone. *J Exp Med* 1983; 157 (6): 2147-53.

Bensinger WI, Buckner CD, Clift RA, Thomas ED. Plasma exchange and plasma modification for the removal of anti-red cell antibodies prior to ABO-incompatible marrow transplant. *J Clin Apheresis* 1987; 3 (3): 174-7.

Bertagnolli MM, Yang L, Herrmann SH, Kirkman RL. Evidence that rapamycin inhibits interleukin-12-induced proliferation of activated T lymphocytes. *Transplantation* 1994; 58: 1091-6.

Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA Jr, Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 1989; 243 (4895): 1160-5

Bierer BE. Cyclosporin A, FK506, and rapamycin: binding to immunophilins and biological action. *Chem Immunol* 1994; 59: 128-55.

Billingham ME, Cary NR, Hammond ME, Kemnitz J, Marboe C, McCallister HA, Snovar DC, Winters GL, Zerbe A. A working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection: Heart Rejection Study Group. The International Society for Heart Transplantation. *J Heart Transplant* 1990; 9 (6): 587-93.

Billingham ME. Diagnosis of cardiac rejection by endomyocardial biopsy. *J Heart Transplant* 1981; 1: 25.

Bilolo KK, Ouyang J, Wang X, Zhu S, Jiang W, Qi S, Xu D, Hebert MJ, Bekersky I, Fitzsimmons WE, Chen H. Synergistic effects of malononitrilamides (FK778, FK779) with tacrolimus (FK506) in prevention of acute heart and kidney allografts rejection and in reversal of ongoing heart allograft rejection in the rat. *Transplantation* 2003; (sous presse).

Blazar BR, Taylor PA, Snover DC, Sehgal SN, Vallera DA. Murine recipients of fully mismatched donor marrow are protected from lethal graft-versus-host disease by the in vivo administration of rapamycin but develop an autoimmune-like syndrome. *J Immunol* 1993; 151 (10): 5726-41.

Block LH, Sutter PM, Mihatsch MJ. Cyclosporin A: pharmacologic activity on the

immune system and effects in clinical organ transplantation. *Klin Wochenschr* 1983; 61 (21): 1053-62.

Bohmova R, Viklicky O. Renal ischemia--reperfusion injury: an inescapable event affecting kidney transplantation outcome. *Folia Microbiol (Praha)* 2001; 46 (4): 267-76.

Bohmova R, Viklicky O. Renal ischemia--reperfusion injury: an inescapable event affecting kidney transplantation outcome. *Folia Microbiol (Praha)* 2001; 46 (4): 267-76.

Boillot O, Baulieux J, Wolf P, Messner M, Cherqui D, Gugenheim J, Pageaux G, Belghiti J, Calmus Y, Le Treut Y, Neau-Cransac M, Samuel D. Low rejection rates with tacrolimus-based dual and triple regimens following liver transplantation. *Clin Transplant* 2001; 15 (3): 159-66.

Bom-van Noorloos AA, Visser JJ, Drexhage HA, Meijer S, Hoitsma HF. Cyclosporin A in orthotopic porcine liver transplantation. Long-term survival after short-term treatment. *Eur Surg Res* 1984; 16 (6): 329-35.

Boots JM, van Duijnhoven EM, Christiaans MH, Nieman FH, van Suylen RJ, van Hooff JP. Single-center experience with tacrolimus versus cyclosporine-Neoral in renal transplant recipients. *Transpl Int* 2001; 14 (6): 370-83.

Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 1976; 6 (4): 468-75.

Borel JF, Feurer C, Magnee C, Stahelin H. Effects of the new anti-lymphocytic peptide cyclosporin A in animals. *Immunology* 1977; 32 (6): 1017-25.

Borel JF. Cyclosporins: basic science summary. *Transplant Proc* 1988; (2 Suppl 2): 722-30.

Borjeson J, Reisfeld R, Chessin LN, Welsh PD, Douglas SD. Studies on human peripheral blood lymphocytes in vitro. I. Biological and physicochemical properties of the pokeweed mitogen. *J Exp Med* 1966; 124 (5): 859-72.

Bottiger Y, Sawe J, Brattstrom C, Tollemar J, Burke JT, Hass G, Zimmerman JJ. Pharmacokinetic interaction between single oral doses of diltiazem and sirolimus in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69 (1): 32-40.

Brabletz T, Pfeuffer I, Schorr E, Siebelt F, Wirth T, Serfling E. Transforming growth factor beta and cyclosporin A inhibit the inducible activity of the interleukin-2 gene in T cells through a noncanonical octamer-binding site. *Mol Cell Biol* 1993; 13 (2): 1155-62.

Bradley LM, Watson SR. Lymphocyte migration into tissue: the paradigm derived from CD4 subsets. *Curr Opin Immunol* 1996; 8 (3): 312-20.

Brennan DC. Action, efficacy and toxicities: Polyclonal antilymphocyte antibodies. Dans Norman DJ, Turka LA, Eds. *Primer on Transplantation*, Second Edition, American Society of Transplantation, 2001.

Brent LB, Eds. *A History of Transplantation Immunology*, San Diego, Academic, 1997.

Brinkmann V, Pinschewer DD, Feng L, Chen S. FTY720: Altered lymphocyte traffic results in allograft protection. *Transplantation* 2001; 72 (5): 764-9.

Briscoe DM, Alexander SI, Lichtman AH. Interactions between T lymphocytes and endothelial cells in allograft rejection. *Curr Opin Immunol* 1998; 10 (5): 525-31.

Briscoe DM, Ganz P, Alexander SI, Melder RJ, Jain RK, Cotran RS, Lichtman AH. The problem of chronic rejection: influence of leukocyte-endothelial interactions. *Kidney Int Suppl* 1997; 58: S22-7.

Briscoe DM, Henault LE, Geehan C, Alexander SI, Lichtman AH. Human endothelial cell costimulation of T cell IFN-gamma production. *J Immunol* 1997; 159 (7): 3247-56.

Brody TM, Larner J, Minneman KP, Eds. *Human pharmacology - Molecular to clinical*. Third Edition, Mosby, 1998.

Broekemeier KM, Pfeiffer DR. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by cyclosporin A during long time frame experiments: relationship between pore opening and the activity of mitochondrial phospholipases. *Biochemistry* 1995; 34 (50): 16440-9.

Bruserud O, Pawelec G. Cyclosporine A and FK506 show similar immunosuppressive effects on long-term in vitro T-cell proliferation. *J Immunopharmac* 1993; 15 (2): 93-7.

Budde K, Schmouder RL, Brunkhorst R, Nashan B, Lucker PW, Mayer T, Choudhury S, Skerjanec A, Kraus G, Neumayer HH. First human trial of FTY720, a novel immunomodulator, in stable renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13 (4): 1073-5.

Bullingham R, Monroe S, Nicholls A, Hale M. Pharmacokinetics and bioavailability of mycophenolate mofetil in healthy subjects after single-dose oral and intravenous administration. *J Clin Pharmacol* 1996; 36 (4): 315-24.

Bunjes D, Hardt C, Rollinghoff M, Wagner H. Cyclosporin A mediates

immunosuppression of primary cytotoxic T cell responses by impairing the release of interleukin 1 and interleukin 2. *Eur J Immunol* 1981; 11 (8): 657-61.

Burckhardt JJ, Guggenheim B. Cyclosporin A: in vivo and in vitro suppression of rat T-lymphocyte function. *Immunology* 1979; 36 (4): 753-7.

Burgering BM, Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 1995; 376 (6541): 599-602.

Burlingham WJ, Grailer AP, Hullett DA, Sollinger HW. Inhibition of both MLC and in vitro IgG memory response to tetanus toxoid by RS-61443. *Transplantation* 1991; 51 (2): 545-7.

Burmester GR, Pezzutto A. Atlas de Poche d'Immunologie. 1^{ère} Édition 2000, Médecine-Sciences, Flammarion.

Calne R, Collier DS, Thiru S. Observations about FK-506 in primates. *Transplant Proc* 1987; 19 (5 Suppl 6): 63.

Calne RY, Collier DstJ, Lim S. Rapamycin for immunosuppression in organ allografting. *Lancet* 1989; 2: 227.

Calne RY, White DJ, Rolles K, Smith DP, Herbertson BM. Prolonged survival of pig orthotopic heart grafts treated with cyclosporin A. *Lancet* 1978a; 1 (8075): 1183-5.

Calne RY, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, Craddock GN, Pentlow BD, Rolles K. Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet* 1978b; 2 (8104-5): 1323-7.

Canadian Multicentre Transplant Group. A randomized clinical trial of cyclosporine in cadaveric renal transplantation. *Engl J Med* 1983; 309 (14): 809-15.

Canadian Society of Transplantation 2002: www.transplant.ca

Cantrell D. T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu Rev Immunol*; 14: 259-74.

Cao W, Mohacsi P, Shorthouse R, Pratt R, Morris RE. Effect of rapamycin on growth factor-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis. *Transplantation* 1995; 59: 390-5.

Cao WW, Kao PN, Chao AC, Gardner P, Ng J, Morris RE. Mechanism of the antiproliferative action of leflunomide: A771726, the active metabolite of leflunomide, does not block T-cell receptor-mediated signal transduction but its antiproliferative effects antagonized by pyrimidine nucleosides. *J heart lung transplant* 1995; 14 (6) pt I: 1016-30.

Carpenter CB. Basic immunogenetics. Dans Norman DJ, Turka LA, Eds. *Primer on Transplantation*, Second edition, American Society of Transplantation, 2001.

Cary N. Heart Transplantation. Dans Thiru S, Waldmann H. Eds. *Pathology and Immunology of Transplantation and rejection*. Blackwell Science, 2001.

Caves PK, Stinson EB, Billingham ME, Shumway NE. Percutaneous transvenous endocardial biopsy in human heart recipients (experience with a new technique). *An Thor Surg* 1973; 16: 325-36.

Chamoun F, Burne M, O'Donnell M, Rabb H. Pathophysiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury. *Front Biosci* 2000; 5: E103-9.

Chandraker A. Ischemia-reperfusion injury in experimental models of organ transplantation. *Transplant Proc* 1999; (5): 2073.

Chang GJ, Mahanty HD, Vincenti F, Freise CE, Roberts JP, Ascher NL, Stock PG, Hirose R. A calcineurin inhibitor-sparing regimen with sirolimus, mycophenolate mofetil, and anti-CD25 mAb provides effective immunosuppression in kidney transplant recipients with delayed or impaired graft function. *Clin Transplant* 2000; 14 (6): 550-4.

Chavin KD, Qin L, Woodward JE, Lin J, Bromberg JS. Anti-CD2 monoclonal antibodies synergize with FK506 but not with cyclosporine or rapamycin to induce tolerance. *Transplantation* 1994; 57 (5): 736-40.

Chen H, Daloze P. Heart transplantation in the rat. Dans Zhang F, Lineaweaver WC, Kao SD, Walker R, Tonken HP, Eds. *Manual of Experimental Muscle Flap and Organ Transplantation Models in the Rat*. Sharpoint, 1995a.

Chen H, Daloze P. Pancreaticoduodenal transplantation in the rat. Dans Zhang F, Lineaweaver WC, Kao SD, Walker R, Tonken HP, Eds. *Manual of Experimental Muscle Flap and Organ Transplantation Models in the Rat*. Sharpoint, 1995b.

Chen H, Luo H, Daloze P, Xu D, Shan X, St-Louis G, Wu J. Long-term in vivo effects of rapamycin on humoral and cellular immune responses in the rat. *Immunobiology* 1993; 188 (3): 303-15.

Chen H, Luo H, Daloze P, Xu D, Wu J. Rapamycin-induced long-term allograft survival depends on persistence of alloantigen. *J Immunol* 1994; 152 (6): 3107-18.

Chen H, Qi S, Xu D, Wu J, Daloze P. The immunosuppressive effect of rapamycin on orthotopic small bowel transplantation. *Transplantation* 1996; 61: 523.

Chen H, Smeesters C, Daloze P. Kidney transplantation in the rat. Dans Zhang F, Lineaweaver WC, Kao SD, Walker R, Tonken HP, Eds. *Manual of Experimental Muscle Flap and Organ Transplantation Models in the Rat*. Sharpoint, 1995c.

Chen H, Wu J, Luo H, Daloze P. Synergistic effect of rapamycin and cyclosporine in pancreaticoduodenal transplantation in the rat. *Transplant Proc* 1992a; 24 (3): 892-3.

Chen H, Wu J, Xu D, Aboujaoude M, Stepkowski S, Kahan B, Daloze P. The effect of rapamycin on orthotopic small bowel transplantation in the rat. *Transplant Proc* 1992b; 24 (3): 1157-8.

Chen H, Wu J, Xu D, Luo H, Daloze PM. Reversal of ongoing heart, kidney, and pancreas allograft rejection and suppression of accelerated heart allograft rejection in the rat by rapamycin. *Transplantation* 1993; 56 (3): 661-6.

Chen H, Xu D, Wu J, Daloze P. Prolongation of hamster to rat xenograft survival by rapamycin. *Transplant Proc* 1992c; 24 (2): 715-6.

Chen HF, Wu J, Luo HY, Daloze P. The immunosuppressive effect of rapamycin on pancreaticoduodenal transplantation in the rat. *Transplant Proc* 1991; 23: 2239.

Chen HF, Wu JP, Luo HY, Daloze PM. Reversal of ongoing rejection of allografts by rapamycin. *Transplant Proc* 1991; 23 (4): 2241-2.

Chen JK, Hoshi H, McKeehan WL. Transforming growth factor type beta specifically

stimulates synthesis of proteoglycan in human adult arterial smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84 (15): 5287-91.

Cheng AM, Rowley B, Pao W, Hayday A, Bolen JB, Pawson T. Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature* 1995; 378 (6554): 303-6.

Cho CS, Elkahwaji J, Chang Z, Scheunemann TL, Manthei ER, Hamawy MM. Modulation of electrophoretic mobility of the linker for activation of T cells (LAT) by the calcineurin inhibitors CsA and FK506: LAT is a potential substrate for PKC and calcineurin signaling pathways. *Cell Signalling* 2002; 15: 85-93.

Chong ASF, Huang W, Liu W, Luo J, Shen J, Shen J, Xu W, Ma L, Blinder L, Xiao F, Xu X, Clardy C, Foster P, Williams JA. In vivo activity of leflunomide: pharmacokinetic analyses and mechanism of immunosuppression. *Transplantation* 1999; 68: 100-9.

Chong ASF, Rezai K, Gebel HM, Finnegan A, Foster P, Xu X, Williams JW. Effects of leflunomide and other immunosuppressive agents on T cell proliferation in vitro. *Transplantation* 1996; 61: 140.

Chou TC, Rideout DC, Eds. *Synergism and Antagonism in Chemotherapy*. Academic Press, San Diego, 1991.

Chou TC, Talalay P. A simple generalized equation for the analysis of multiple inhibitions of Michaelis-Menten kinetics systems. *J Biol Chem* 1977; 252: 6438-42.

Chou TC, Talalay P. Analysis of combined drug effects: A new look at a very old problem. *Trends Pharmacol Sci* 1983; 4: 450-4.

Chou TC, Talalay P. Applications of the median-effect principle for the assessment of low-dose risk of carcinogens and for the quantitation of synergism and antagonism of chemotherapeutic agents. Dans Harrap KR, Ed. New Avenues in Developmental Cancer Chemotherapy, Bristol-Myers Symposium series, Academic Press, New York, 1987.

Chou TC, Talalay P. Generalized equations for the analysis of inhibitors of Michaelis-Menten and higher order kinetic systems with two or more mutually exclusive and nonexclusive inhibitors. Eur J Biochem 1981; 115: 207-16.

Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: The combined effects of multiples drugs or enzyme inhibitors. Adv Enz Regul 1984; 22: 27-55.

Chou TC. Comparison of dose-effect relationships of carcinogens following low-dose chronic exposure and high-dose single injection: An analysis by the median-effect principle. Carcinogenesis 1980; 1: 203-13.

Chou TC. Derivation and properties of Michaelis-Menten type and Hill type equations for reference ligands. J Theoret Biol 1976; 39: 253-76.

Chou TC. On the determination of availability of ligand binding sites in steady-state systems. J Theoret Biol 1977; 65: 345-56.

Chou TC. Relationships between inhibition constants and fractional inhibitions dans enzyme-catalyzed reactions with different numbers of reactants, different reaction mechanisms, and different types of mechanisms of inhibition. Mol Pharmacol 1974; 10: 235-47.

Chou TC. The median-effect principle and combination index for quantification of synergism and antagonism. Dans Chou TC, Rideout D, Eds. Synergism and antagonism in chemotherapy. San Diego, Academic Press, 1991.

Christians U, Strohmeyer S, Kownatzki R, Schiebel HM, Bleck J, Greipel J, Kohlhaw K, Schottmann R, Sewing KF. Investigations on the metabolic pathways of cyclosporine: I. Excretion of cyclosporine and its metabolites in human bile--isolation of 12 new cyclosporine metabolites. *Xenobiotica* 1991; 21 (9): 1185-98.

Chung J, Kuo CJ, Crabtree GR, Blenis J. Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell* 1992; 69 (7): 1227-36.

Clarke SJ, McStay GP, Halestrap AP. Sanglifehrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A. *J Biol Chem* 2002; 277 (38): 34793-9.

Cline JC, Nelson JD, Gerzon K, Williams RH, Delong DC. In vitro antiviral activity of mycophenolic acid and its reversal by guanine-type compounds. *Appl Microbiol* 1969; 18 (1): 14-20.

Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 1992; 357 (6380): 695-7.

Coffman T.M., dans Norman D.J., Suki W.N., 1998. Inflammatory response to allografts. *Primer on Transplantation*.

Coffman TM, Inflammatory response to allografts. Dans Norman DJ, Suki WN, Eds. *Primer On Transplantation*, The American Society of Transplant Physician, 1998.

Cohen DJ. Action, efficacy and toxicities: corticosteroids. Dans Norman DJ, Turka LA, Eds. *Primer on Transplantation*, Second Edition, American Society of Transplantation, 2001.

Coito AJ, Korom S, Graser E, Volk HD, Van De Water L, Kupiec-Weglinski JW. Blockade of very late antigen-4 binding to fibronectin in allograft recipients. I. Treatment with connecting segment-1 peptides prevents acute rejection by suppressing intragraft mononuclear cell accumulation, endothelial activation, and cytokine expression. *Transplantation* 1998; 65 (5): 699-706.

Coito AJ, Kupiec-Weglinski JW. Extracellular matrix proteins in organ transplantation. *Transplantation* 2000; 69 (12): 2465-73.

Collier DS, Calne RY, Pollard SG, Friend PJ, Thiru S. Rapamycin in experimental renal allografts in primates. *Transplant Proc* 1991; 23 (4): 2246-7.

Collier DS, Calne R, Thiru S, Lim S, Pollard SG, Barron P, Da Costa M, White DJ. Rapamycin in experimental renal allografts in dogs and pigs. *Transplant Proc* 1990; 22 (4): 1674-5.

Colombani PM, Robb A, Hess AD. Cyclosporin A binding to calmodulin: a possible site of action on T lymphocytes. *Science* 1985; 228 (4697): 337-9.

Combalbert J, Fabre I, Fabre G, Dalet I, Derancourt J, Cano JP, Maurel P. Metabolism of cyclosporin A. IV. Purification and identification of the rifampicin-inducible human liver cytochrome P-450 (cyclosporin A oxidase) as a product of P450III_A gene subfamily. *Drug Metab Dispos* 1989; 17 (2): 197-207.

Cornall RJ, Cheng AM, Pawson T, Goodnow CC. Role of Syk in B-cell development and antigen-receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97 (4): 1713-8.

Corsi M.M., Leone G., Fulgenzi A., Wasserman K., Leone F., Ferrero M.E., 1999. RANTES and MCP-1 chemokine plasma levels in chronic renal transplant dysfunction and chronic renal failure. *Clinical Biochemistry*, 32(6): 455-460.

Cosio FG, Dillon JJ, Falkenhain ME, Tesi RJ, Henry ML, Elkhammas EA, Davies EA, Bumgardner GL, Ferguson RM. Racial differences in renal allograft survival: the role of systemic hypertension. *Kidney Int* 1995; 47 (4): 1136-41.

Cosio FG, Qiu W, Henry ML, Falkenhain ME, Elkhammas EA, Davies EA, Bumgardner GL, Ferguson RM. Factors related to the donor organ are major determinants of renal allograft function and survival. *Transplantation* 1996; 62 (11): 1571-6.

Cursio R. Ischémie-reperfusion. *Presse Med* 2001; 30 (24): 29-30.

Czech J, Kurrle R, Schorlemmer HU. The antiproliferative effect of malononitrilamides (MNAs) on vascular smooth muscle cells is antagonized by exogenous uridine. *Inflamm Res* 1999; 48 Suppl 2: S128-9.

Dadgostar H, Zarnegar B, Hoffmann A, Qin XF, Truong U, Rao G, Baltimore D, Cheng G. Cooperation of multiple signaling pathways in CD40-regulated gene expression in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99 (3): 1497-502.

Daemen MA, de Vries B, Buurman WA. Apoptosis and inflammation in renal reperfusion injury. *Transplantation* 2002; 73 (11): 1693-700.

Dai Z, Konieczny BT, Baddoura FK, Lakkis FG. Impaired alloantigen mediated T cell apoptosis and failure to induce long term allograft survival in IL-2 deficient mice. *J Immunol* 1998; 161: 1659-63.

Daniel C, Horvath S, Allen PM. A basis for alloreactivity: MHC helical residues broaden peptide recognition by the TCR. *Immunity* 1998; 8 (5): 543-52.

Davis JP, Cain GA, Pitts WJ, Magolda RL, Copeland RA. The immunosuppressive metabolite of leflunomide is a potent inhibitor of human dihydroorotate dehydrogenase. *Biochemistry* 1996; 35 (4): 1270-3.

Dawson JR, Vidal AC, Malyguine AM. Natural killer cell-endothelial cell interactions in xenotransplantation. *Immunol Res* 2000; 22 (2-3): 165-76.

de Mattos AM, Olyaei AJ, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenges for the future. *Am J Kidney Dis* 2000; 35 (2): 333-46.

de Mattos AM, Olyaei AJ, Bennett WM. Pharmacology of immunosuppressive medications used in renal diseases and transplantation. *Am J of Kidney Dis* 1996, 28 (5): 631-66.

de Mattos AM. Action, efficacy and toxicities: azathioprine. Dans Norman DJ, Turka LA, Eds. *Primer on Transplantation, Second Edition*, American Society of Transplantation, 2001.

Decker T, Hipp S, Ringshausen I, Bogner C, Oelsner M, Schneller F, Peschel C. Rapamycin-induced G1 arrest in cycling B-CLL cells is associated with reduced expression of cyclin D3, cyclin E, cyclin A, and survivin. *Blood* 2003; 101 (1): 278-85.

Deierhoi MH, Kauffman RS, Hudson SL, Barber WH, Curtis JJ, Julian BA, Gaston RS, Laskow DA, Diethelm AG. Experience with mycophenolate mofetil (RS61443) in renal transplantation at a single center. *Ann Surg* 1993; 217 (5): 476-82; discussion 482-4.

Demirci G, Hoshino K, Nashan B. Expression patterns of integrin receptors and extracellular matrix proteins in chronic rejection of human liver allografts. *Transpl Immunol* 1999; 7 (4): 229-37.

Deppe CE, Heering PJ, Tinel H, Kinne-Saffran E, Grabensee B, Kinne RK. Effect of cyclosporine A on Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter, and H⁺/K⁺-ATPase in MDCK cells and two subtypes, C7 and C11. *Exp Nephrol* 1997; 5 (6): 471-80.

Devlin J, Palmer RM, Gonde CE, O'Grady J, Heaton N, Tan KC, Martin JF, Moncada S, Williams R. Nitric oxide generation. A predictive parameter of acute allograft rejection. *Transplantation* 1994; 58 (5): 592-5.

DeVries ME, Hosiawa KA, Cameron CM, Bosinger SE, Persad D, Kelvin AA, Coombs JC, Wang H, Zhong R, Cameron MJ, Kelvin DJ. The role of chemokines and chemokine receptors in alloantigen-independent and alloantigen-dependent transplantation injury. *Semin Immunol* 2003; 15 (1): 33-48.

Di Joseph JF, Sehgal SN. Functional and histopathologic effects of rapamycin on mouse kidney. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1993; 15 (1): 45-56.

Di Lisa F, Menabo R, Canton M, Barile M, Bernardi P. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD⁺ and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem* 2001; 276 (4): 2571-5.

Dintenfass L, Stewart JH. Aggregation of red cells and plasma viscosity in renal patients treated by haemodialysis or kidney graft effect of proteins and ABO blood groups. *Microvasc Res* 1974 May;7(3):342-50.

Döring H, Denhnert H, Eds. *The Isolated Perfused Warm-Blooded Heart According to Langendorff*. 1st English Edition, 1988.

Dragun D, Hoff U, Park JK, Qun Y, Schneider W, Luft FC, Haller H. Prolonged cold preservation augments vascular injury independent of renal transplant immunogenicity and function. *Kidney Int* 2001; 60 (3): 1173-81.

Dragun D, Hoff U, Park JK, Qun Y, Schneider W, Luft FC, Haller H. Ischemia-reperfusion injury in renal transplantation is independent of the immunologic background. *Kidney Int* 2000; 58 (5): 2166-77.

Duguay P, Chen H, Daloze P, Dumont L. Cardioprotective effects of the lazaroïd U74389G following cold preservation and transplantation of rat hearts. *Transplantation* 1996; 61 (7): 1023-8.

Dumont FJ, Melino MR, Saruch MJ, Koprak SL, Fischer PL, Sigal NA. The immunosuppressive macrolides FK506 and rapamycin act as reciprocal antagonists in murine T cells. *J Immunol* 1990; 144: 1418-24.

Dumont FJ, Staruch MJ, Koprak SL, Siekierka JJ, Lin CS, Harrison R, Sewell T, Kindt VM, Beattie TR, Wyvratt M, Sigal NH. The immunosuppressive and toxic effects of FK506 are mechanistically related: Pharmacology of a novel antagonist of FK506 and rapamycin. *J Exp Med* 1992; 176: 751-60.

Dunn CJ, Wagstaff AJ, Perry CM, Plosker GL, Goa KL. Cyclosporin: an updated review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (neoral) in organ transplantation. *Drugs* 2001; 61 (13): 1957-2016.

Duquesnoy RJ. History of transplantation immunology (Part 1 of 2) 2002a; <http://tpis.upmc.edu/tpis/immuno/wwwHISTpart1.htm>

Duquesnoy RJ. Early history of transplantation immunology (Part 2 of 2) 2002b; <http://tpis.upmc.edu/tpis/immuno/wwwHISTpart2.html>

E Kao KJ, Scornik JC, Small SJ. Enzyme-linked immunoassay for anti-HLA antibodies--an alternative to panel studies by lymphocytotoxicity. *Transplantation* 1993; 55 (1): 192-6.

Eckhoff DE, McGuire BM, Frenette LC, Contreras JL, Hudson SL, Bynon JS. Tacrolimus (FK506) and mycophenolate mofetil combination therapy versus tacrolimus in adult liver transplantation. *Transplantation* 1998; 65 (2): 180-7.

Elder RT, Xu X, Williams JW, Gong H, Finnegan A, Chong ASF. The immunosuppressive metabolite of leflunomide, A771726, affects murine T cells through two biochemical mechanisms. *J Immunol* 1997; 159 (1): 22-7.

Elices MJ, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyj S, Hemler ME, Lobb RR. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 1990; 60 (4): 577-84.

Ellery JM, Nicholls PJ. Alternate signalling pathways from the interleukin-2 receptor. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002 Feb;13(1):27-40.

El-Sabroun R, Weiss R, Butt F, Rashid I, Delaney V, Qadir M, Hanson P, Butt K. Improved lipid profile and blood sugar control in pediatric renal transplant recipients using sirolimus-tacrolimus combination. *Transplant Proc* 2002; 34 (5): 1946-7.

el-Sawy T, Fahmy NM, Fairchild RL. Chemokines: directing leukocyte infiltration into allografts. *Curr Opin Immunol* 2002; 14 (5): 562-8.

Elssner A., Jaumann F., Dobmann S., Behr J., Schwaiblmair M., Reichenspurner H., Fürst H., Briegel J., Vogelmeier C. Elevated levels of interleukin-8 and transforming growth factor-beta in bronchoalveolar lavage fluid from patients with bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation* 2000 ; 70 (2): 362-7.

Engel P, Zhou LJ, Ord DC, Sato S, Koller B, Tedder TF. Abnormal B lymphocyte development, activation, and differentiation in mice that lack or overexpress the CD19 signal transduction molecule. *Immunity* 1995; 3 (1): 39-50.

Ensley RD, Bristow MR, Olsen SL, Taylor DO, Hammond EH, O'Connell JB, Dunn D, Osburn L, Jones KW, Kauffman RS, et al. The use of mycophenolate mofetil (RS-61443) in human heart transplant recipients. *Transplantation* 1993; 56 (1): 75-82.

Ensminger SM, Spriewald BM, Witzke O, Pajaro OE, Yacoub MH, Morris PJ, Rose ML, Wood KJ. Indirect allorecognition can play an important role in the development of transplant arteriosclerosis. *Transplantation* 2002; 73 (2): 279-86.

Ericzon BG, Kubota K, Groth CG, Wijnen R, Tiebosch T, Buurman W, Kootstra G. Pancreaticoduodenal allotransplantation with FK 506 in the cynomolgus monkey. *Transplant Proc* 1990; 22 (1): 72-3.

Erich HA, Opelz G, Hansen J. HLA DNA typing and transplantation. *Immunity* 2001; 14 (4): 347-56.

Espevik T, Figari IS, Shalaby MR, Lackides GA, Lewis GD, Shepard HM, Palladino MA Jr. Inhibition of cytokine production by cyclosporin A and transforming growth factor beta. *J Exp Med* 1987; 166 (2): 571-6.

Eugui EM, Almquist SJ, Muller CD, Allison AC. Lymphocyte-selective cytostatic and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in vitro: role of deoxyguanosine nucleotide depletion. *Scand J Immunol* 1991; 33 (2): 161-73.

Eugui EM, Mirkovich A, Allison AC. Lymphocyte-selective antiproliferative and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in mice. *Scand J Immunol* 1991; 33 (2): 175-83.

European Multicentre Trial Group. Cyclosporin in cadaveric renal transplantation: one-year follow-up of a multicentre trial. *Lancet* 1983; 2 (8357): 986-9.

European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and corticosteroids for prevention of acute rejection. *Lancet* 1995; 345: 1321-5.

Farmer DG, Amersi F, Shen XD, Gao F, Anselmo D, Ma J, Dry S, McDiarmid SV, Shaw G, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski J. Improved survival through the reduction of ischemia-reperfusion injury after rat intestinal transplantation using selective P-selectin blockade with P-selectin glycoprotein ligand-Ig. *Transplant Proc* 2002; 34 (3): 985.

Figueroa J, Fuad SA, Kunjummen BD, Platt JL, Bach FH. Suppression of synthesis of natural antibodies by mycophenolate mofetil (RS-61443). Its potential use in discordant xenografting. *Transplantation* 1993; 55 (6): 1371-4.

Fisher B, Lee S. Microvascular surgical techniques in research: with special reference to renal transplantation in the rat. *Surgery* 1965; 58: 904.

Flechner SM, Goldfarb D, Modlin C, Feng J, Krishnamurthi V, Mastroianni B, Savas K, Cook DJ, Novick AC. Kidney transplantation without calcineurin inhibitor drugs: a prospective, randomized trial of sirolimus versus cyclosporine. *Transplantation* 2002; 74 (8): 1070-6.

Foy TM, Aruffo A, Bajorath J, Buhlmann JE, Noelle RJ. Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu Rev Immunol*; 14: 591-617.

Franklin TJ, Cook JM. Inhibition of guanine nucleotide biosynthesis by mycophenolic acid in Yoshida ascites cells. *Biochem Pharmacol* 1971; 20 (6): 1334-8.

Franklin TJ, Cook JM. The inhibition of nucleic acid synthesis by mycophenolic acid. *Biochem J* 1969; 113 (3): 515-24.

Frasca L, Amendola A, Hornick P, Brookes P, Aichinger G, Marelli-Berg F, Lechler RI, Lombardi G. Role of donor and recipient antigen-presenting cells in priming and maintaining T cells with indirect allospecificity. *Transplantation* 1998; 66 (9): 1238-43.

Frater-Schroder M, Muller G, Birchmeier W, Bohlen P. Transforming growth factor-beta inhibits endothelial cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 137 (1): 295-302.

Fuggle SV, Koo DDH. Cell adhesion molecules in clinical renal transplantation. *Transplantation* 1998; 65 (6): 763-9.

Fuller TF, Sattler B, Binder L, Vetterlein F, Ringe B, Lorf T. Reduction of severe ischemia/reperfusion injury in rat kidney grafts by a soluble P-selectin glycoprotein ligand. *Transplantation* 2001; 72 (2): 216-22.

Fulton B, Markham A. Mycophenolate mofetil: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical efficacy in renal transplantation. *Drugs* 1996; 51 (2): 278-98.

Fung JJ, Demetris AJ, Porter KA, Iwatsuki S, Gordon RD, Esquivel CO, Jaffe R, Tzakis A, Shaw BW Jr, Starzl TE. Use of OKT3 with cyclosporin and steroids for reversal of acute kidney and liver allograft rejection. *Nephron* 1987; 46 Suppl 1:19-33.

Furie B, Furie BC. The molecular basis of platelet and endothelial cell interaction with neutrophils and monocytes: role of P-selectin and the P-selectin ligand, PSGL-1. *Thromb Haemost* 1995; (1): 224-7.

Gardner LB, Guttman RD, Merrill JP. Renal transplantation in the inbred rat. IV. Alterations in the microvasculature in acute unmodified rejection. *Transplantation* 1968; 6 (3): 411-8.

Gauld SB, Dal Porto JM, Cambier JC. B cell antigen receptor signaling: roles in cell development and disease. *Science* 2002; 296 (5573): 1641-2.

Gerauer K, Maier S, Emmanuilidis K, Chambron N, Zantl N, Pfeffer K, Heidecke CD. Long-term cardiac allograft survival in mice treated with malononitrilamide 715. *Transplant Proc* 1998; 30 (8): 4205-6.

Gillman T. On the possible roles of arterial growth, remodeling, repair, and involution in the genesis of arterial degeneration. *Ann N Y Acad Sci* 1968; 149 (2): 731-51.

Gonwa TA, Hricik DE, Brinker K, Grinyo JM, Schena FP; Sirolimus Renal Function Study Group. Improved renal function in sirolimus-treated renal transplant patients after early cyclosporine elimination. *Transplantation* 2002; 74 (11): 1560-7.

Gorer PA. The genetic and antigenic basis of tumor transplantation. *J Pathol Bacteriol* 1937; 44: 691-7.

Goto T, Kino T, Hatanaka H, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H. FK506: Historical perspectives. *Transplant Proc* 1991; 23 (6): 2713-7.

Gould DS, Auchincloss H Jr. Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol Today* 1999; 20 (2): 77-82.

Gourishankar S, Halloran PF. Action, efficacy and toxicities: mycophenolate mofetil. Dans Norman DJ, Turka LA, Eds. *Primer on Transplantation*, Second Edition, American Society of Transplantation, 2001.

Grailer A, Nichols J, Hullett D, Sollinger HW, Burlingham WJ. Inhibition of human B cell responses in vitro by RS-61443, cyclosporine A and DAB486 IL-2. *Transplant Proc* 1991; 23 (1 Pt 1): 314-5.

Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 1999; 285 (5425): 221-7.

Green CJ, Allison AC. Extensive prolongation of rabbit kidney allograft survival after short-term cyclosporin-A treatment. *Lancet* 1978; 1 (8075): 1182-3.

Greene S, Watanabe K, Braatz-Trulson J, Lou L. Inhibition of dihydroorotate dehydrogenase by the immunosuppressive agent leflunomide. *Biochem Pharmacol* 1995; 50 (6): 861-7.

Gregory CR, Huang X, Pratt RE, Dzau VJ, Shorthouse R, Billingham ME, Morris RE. Treatment with rapamycin and mycophenolic acid reduces arterial intimal thickening produced by mechanical injury and allows endothelial replacement. *Transplantation* 1995; 59 (5): 655-61.

Gregory CR, Silva HT, Patz JD, Morris RE. Comparative effects of malononitrilamide analogs of leflunomide on whole blood lymphocyte stimulation in humans, rhesus macaques, cats, dogs, and rats. *Transplant Proc* 1998; 30 (4): 1047-8.

Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:111-35.

Griffin JD, Spertini O, Ernst J, Belvin P, Levin B, Kanakura Y, Tedder TF. Granulocyte-macrophage colony-stimulation factor and other cytokines regulate surface expression of the leukocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils, monocytes, and their precursors. *J Immunol* 1990; 145: 576-84.

Groth CG, Longmire WP Jr, Eds. Historical landmarks in clinical transplantation. *World J Surg* 2000; 24: 755-843.

Gu Y, Li J, Li N. Insulin sensitivity after pancreaticoduodenal transplantation with systemic and portal venous drainage in inbred rats. *Chin Med J (Engl)* 2002; 115 (4): 549-51.

Gullestad L., Simonsen S., Ueland T., Holm T., Aass H., Andreassen A. K., Madsen S., Geiran O., Frøland S. S., Aukrust P. Possible role of proinflammatory cytokines in heart allograft coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1999; 84: 999-1003.

Gurley KE, Lowry RP, Forbes RD. Immune mechanisms in organ allograft rejection. II. T helper cells, delayed-type hypersensitivity, and rejection of renal allografts. *Transplantation* 1983; 36 (4): 401-5.

Guttmann RD, Lindquist RR, Parker RM, Carpenter CB, Merrill JP. Renal transplantation in the inbred rat. I. Morphologic, immunologic, and functional alterations during acute rejection. *Transplantation* 1967; 5 (4): 668-81.

Gysemans C, Waer M, Laureys J, Bouillon R, Mathieu C. Leflunomide and its analogue X920715 synergize with cyclosporin A in preventing early graft failure and delaying graft rejection of xenogeneic islets in nonobese diabetic mice. *Transplant Proc* 2001; 33 (3): 2094-5.

Halestrap AP, Connern CP, Griffiths EJ, Kerr PM. Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* 1997; 174 (1-2): 167-72.

Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury in the heart. *Biochimica et biophysica acta* 1998. 1366: 79-94.

Halloran PF, Gourishankar S. Historical overview of pharmacology and immunosuppression. Dans Norman DJ, Turka LA, Eds. Primer on Transplantation, Second Edition, American Society of Transplantation, 2001a.

Halloran PF, Gourishankar S. Principles and overview of immunosuppression. Dans Norman DJ, Turka LA, Eds. Primer on Transplantation, Second Edition, American Society of Transplantation, 2001b.

Hammond EH, Yowell RL, Nunoda S, Menlove RL, Renlund DG, Bristow MR, Gay WA Jr, Jones KW, O'Connell JB. Vascular (humoral) rejection in heart transplantation: pathologic observations and clinical implications. J Heart Transplant 1989; 8 (6): 430-43.

Hammond EH, Yowell RL, Nunoda S. Vascular (humoral) rejection in heart transplantation: pathologic observations and clinical implications. Transplant Proc 1991; 23 (2): 26.

Hancock WW. Xenotransplantation. Dans Norman DJ, Suki WN, Eds. Primer on Transplantation. The American Society of Transplant Physicians, 1998.

Handschumacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ, Speicher DW. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. Science 1984; 226 (4674): 544-7.

Hao L, Lafferty KJ, Allison AC, Eugui EM. RS-61443 allows islet allografting and specific tolerance induction in adult mice. Transplant Proc 1990; 22 (2): 876-9.

Hara K, Yonezawa K, Weng QP, Kozlowski MT, Belham C, Avruch J. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. J Biol Chem 1998; 273 (23): 14484-94.

Harlan WR Jr, Holden KR, Williams GM, Hume DM. Proteinuria and nephrotic syndrome associated with chronic rejection of kidney transplants. *N Engl J Med* 1967; 277 (15): 769-76.

Hartner WC, Van der Werf WJ, Lodge JP, Gilchrist B, De Fazio SR, Markees TG, Yatko C, Monaco AP, Gozzo JJ. Effect of rapamycin on renal allograft survival in canine recipients treated with antilymphocyte serum, donor bone marrow, and cyclosporine. *Transplantation* 1995; 60 (11): 1347-50.

Hausen B, Boeke K, Berry GJ, Gummert JF, Christians U, Morris RE. Potentiation of immunosuppressive efficacy by combining the novel leflunomide analog, HMR 279, with microemulsion cyclosporine in a rat lung transplant model. *Transplantation* 1999; 67 (3): 354-9.

Hayashi T, Faustman D. A role for NF-kappaB and the proteasome in autoimmunity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2000; 48 (5): 353-65.

Häyry P. Chronic rejection: risk factors, regulation, and possible sites of therapeutic intervention. *Transplant Proc* 1998; 30: 2407-10.

Häyry P., Myllärniemi., Calderon Ramirez L., Aavik E., Loubtchenkov M., Koskinen P., Lemström K., Räisänen-Sokolowski A. Immunobiology and pathology of chronic rejection. *Transplant Proc* 1997; 29: 77-8.

Hayward R, Campbell B, Shin YK, Scalia R, Lefer AM. Recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand-1 protects against myocardial ischemic reperfusion injury in cats. *Cardiovasc Res* 1999; 41 (1): 65-76.

Helderman JH. Action, efficacy and toxicities: cyclosporine. Dans Norman DJ, Turka LA, Eds. *Primer on Transplantation*, Second Edition, American Society of Transplantation, 2001.

Hendey B, Klee CB, Maxfield FR. Inhibition of neutrophil chemokinesis on vitronectin by inhibitors of calcineurin. *Science* 1992; 258 (5080): 296-9.

Hering BJ, Ricordi C, Sutherland D, Bluestone JA. Pancreatic islet cell transplantation dans Norman DJ, Turka LA, eds. *Primer on Transplantation*, Second Edition, American Society of Transplantation, 2001.

Herrero-Fresneda I, Torras J, Cruzado JM, Condom E, Vidal A, Riera M, Lloberas N, Alsina J, Grinyo JM. Do alloreactivity and prolonged cold ischemia cause different elementary lesions in chronic allograft nephropathy? *Am J Pathol* 2003; 162 (1): 127-37.

Herskowitz A, Mellits ED, Traill TA. Histologic predictors of acute cardiac rejection in serial human biopsies : a multivariate analysis. *J Am Coll Cardiol* 1987; 9: 802-10.

Hirano T, Nakafusa Y, Kawano R, Motoyama K, Arima T, Sugitani A, Tanaka M. The combined use of prostaglandin I₂ analogue (OP-2507) and thromboxane A₂ synthetase inhibitor (OKY-046) strongly inhibits atherosclerosis of aortic allografts in rats. *Surgery* 2001 May;129(5):595-605.

Hock H, Dorsch M, Diamantstein T, Blankenstein T. Interleukin 7 induces CD4⁺ T cell-dependent tumor rejection *J Exp Med* 1991; 174 (6): 1291-8.

Hodge EE, Inman SR, Stowe NT, Novick AC. Cyclosporine A enhances the vascular reactivity to angiotensin II in the renal microcirculation in rodents. *Transplant Proc* 1996; 28 (2): 893-5.

Hoffman AL, Makowka L, Banner B, Cai X, Cramer DV, Pascualone A, Todo S, Starzl TE. The use of FK-506 for small intestine allotransplantation. Inhibition of acute rejection and prevention of fatal graft-versus-host disease. *Transplantation* 1990; 49 (3): 483-90.

Holt DW, Johnston A. The impact of cyclosporin formulation on clinical outcomes. *Transplant Proc* 2000; 32 (7): 1552-5.

Hong JC, Kahan BD. Sirolimus-induced thrombocytopenia and leukopenia in renal transplant recipients: risk factors, incidence, progression, and management. *Transplantation* 2000; 69 (10): 2085-90.

Hong JC, Kahan BK. Immunosuppressive agents in organ transplantation: past, present, future. *Semin Nephrol* 2000; 20 (2): 108-25.

Hori J, Isobe M, Yamagami S, Tsuru T. Acceptance of second corneal allograft by combination of anti-VLA-4 and anti-LFA-1 monoclonal antibodies in mice. *Transplant Proc* 1998; 30: 200.

Hori J, Yamagami S, Obata H, Tsuru T, Isobe M. Effect of monoclonal antibody to VLA-4 on corneal allograft survival in mice. *Transplant Proc* 1996; 28 (3): 1990-1.

Hosenpud JD, Bennett LE. Mycophenolate mofetil versus azathioprine in patients surviving the initial cardiac transplant hospitalization: an analysis of the Joint UNOS/ISHLT Thoracic Registry. *Transplantation* 2001; 72 (10): 1662-5.

Hoy WE, Nelson DS. Delayed-type hypersensitivity in mice after skin and tumour allografts and tumour isografts. *Nature* 1969; 222 (197): 1001-3.

Hunig T, Bevan MJ. Specificity of T-cell clones illustrates altered self hypothesis. *Nature* 1981; 294 (5840): 460-2.

Hutchinson IV. An endothelin-transforming growth factor beta pathway in the nephrotoxicity of immunosuppressive drugs. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998; 7 (6): 665-71.

Ikonen TS, Gummert JF, Hayase M, Honda Y, Hausen B, Christians U, Berry G, Yock PG, Morris RE. Sirolimus (rapamycin) halts and reverses progression of allograft vascular disease in non-human primates. *Transplantation* 2000; 70 (6): 969-75.

Inselmann G, Blank M, Baumann K. Cyclosporine A induced lipid peroxidation in microsomes and effect on active and passive glucose transport by brush border membrane vesicles of rat kidney. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1988; 62 (2): 207-20.

Ishii T, Kim YI, Tatsuma T, Kawano K, Kai T, Kobayashi M. Immunodepressants ameliorate normothermic ischemia injury to the rat liver by down-regulating tumor necrosis factor, not by alleviation of lipid peroxidative injury. *Transpl Int* 1994; 7 Suppl 1: S507-11.

Isobe M, Hori J, Suzuki J. Immunosuppression by blocking alpha 4-integrins/VCAM-1 adhesion. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998; 231: 85-98.

Isobe M, Suzuki JI, Yagita H, Okumura KO, Yamazaki S, Nagai R, Yazaki Y, Sekiguchi M. Immunosuppression to cardiac allografts and soluble antigens by anti-vascular cellular adhesion molecule-1 and anti-very late antigen-4 monoclonal antibodies. *J Immunol* 1994; 153: 5810-8.

Ito H, Kasagi N, Shomori K, Osaki M, Adachi H. Apoptosis in the human allografted kidney. Analysis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated DUTP-biotin nick end labeling. *Transplantation* 1995; 60 (8): 794-8.

Jain AB, Hamad I, Rakela J, Dodson F, Kramer D, Demetris J, McMichael J, Starzl TE, Fung JJ. A prospective randomized trial of tacrolimus and prednisone versus tacrolimus, prednisone, and mycophenolate mofetil in primary adult liver transplant recipients: an interim report. *Transplantation* 1998; 66 (10): 1395-8.

Jain J, McCaffrey PG, Miner Z, Kerppola TK, Lambert JN, Verdine GL, Curran T, Rao A. The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature* 1993; 365 (6444): 352-5.

Jain J, Valge-Archer VE, Rao A. Analysis of the AP-1 sites in the IL-2 promoter. *J Immunol* 1992; 148 (4): 1240-50.

Jain S, Bicknell GR, Whiting PH, Nicholson ML. Rapamycin reduces expression of fibrosis-associated genes in an experimental model of renal ischaemia reperfusion injury. *Transplant Proc* 2001; 33 (1-2): 556-8.

Jain S, Furness PN, Nicholson ML. The role of transforming growth factor beta in chronic renal allograft nephropathy. *Transplantation* 2000 May 15;69(9):1759-66.

Jamieson SW, Burton NA, Bieber CP, Reitz BA, Oyer PE, Stinson EB, Shumway NE. Cardiac-allograft survival in primates treated with cyclosporin A. *Lancet* 1979; 1 (8115): 545.

Markwick JR, Chambers JD, Hobbs JR, Pegrum GD. Timing of cyclosporin-A therapy for abrogation of HVG and GVH responses in rats. *Lancet* 1979; 2 (8151): 1037-40.

Janeway CA Jr, Travers P, Eds. *Immunobiologie*. DeBoeck Université, 1997.

Jayarane S, Ramesh P, Nadesan V. Immune haemolysis after renal transplantation secondary to ABO minor-mismatch between donor and recipient. *Singapore Med J* 2002; 43 (8): 421-2.

Jiang H, Kobayashi M. Differences between cyclosporin A and tacrolimus in organ transplantation. *Transplant Proc* 1999; 31 (5): 1978-80.

Jin MB, Nakayama M, Ogata T, Fujita M, Mino K, Taniguchi M, Suzuki T, Shimamura T, Furukawa H, Todo S. A novel leflunomide derivative, FK778, for immunosuppression after kidney transplantation in dogs. *Surgery* 2002; 132 (1): 72-9.

Jindal RM, Sidner RA, Milgrom ML. Post-transplant diabetes mellitus. The role of immunosuppression. *Drug Saf* 1997; 16 (4): 242-57.

Jolicoeur EM, Qi S, Xu D, Dumont L, Daloze P, Chen H. Combination therapy of mycophenolate mofetil and rapamycin in prevention of chronic renal allograft rejection in the rat. *Transplantation* 2003; 75 (1): 54--9.

Jolicoeur EM. Le mycophénolate mofétil et la rapamycine inhibent le rejet chronique allogreffe du rein chez le rat . Université de Montréal, 2001.

Jones EL, Epinette WW, Hackney VC, Menendez L, Frost P. Treatment of psoriasis with oral mycophenolic acid. *J Invest Dermatol* 1975; 65 (6): 537-42.

Kagi D, Ledermann B, Burki K, Seiler P, Odermatt B, Olsen KJ, Podack ER, Zinkernagel RM, Hengartner H. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 1994; 369 (6475): 31-7.

Kahan BD, Gibbons S, Tejpal N, Stepkowski SM, Chou TC. Synergistic interactions of cyclosporine and rapamycin to inhibit immune performances of normal human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Transplantation* 1991; 51 (1): 232-9.

Kahan BD, Jordan S, Holmes S, Katz S, Van Buren CT, Napoli KL. Dose/concentration relation to outcome in sirolimus treated renal allograft recipient. *Am Soc Transp Surg* 1995; 21: 203.

Kahan BD, Kaplan B, Lorber MI, Winkler M, Cambon N, Boger RS. RAD in de novo renal transplantation: comparison of three doses on the incidence and severity of acute rejection. *Transplantation* 2001; 71 (10): 1400-6.

Kahan BD, Tejpal N, Gibbons-Stubbers S, Tu Y, Wang M, Stepkowski S, Chou TC. The synergistic interactions in vitro and in vivo of brequinar sodium with cyclosporine or rapamycin alone and in triple combination. *Transplantation* 1993; 55 (4): 894-900.

Kahan BD. Cyclosporine. *Engl J Med* 1989; 321 (25): 1725-38.

Kahan BD. Cyclosporine: a powerful addition to the immunosuppressive armamentarium. *Am J Kidney Dis* 1984; 3 (6): 444-55.

Kahan BD. Efficacy of sirolimus compared with azathioprine for reduction of acute renal allograft rejection: a randomised multicentre study. The Rapamune US Study Group. *Lancet* 2000; 356 (9225): 194-202.

Kahan BD. Future directions in the development of small molecule immunosuppressants. *Curr Opin Org Transplant* 2002; 7: 337-41.

Kahan BD. Immunosuppressive therapy. *Curr Opin Immunol* 1992; 4 (5): 553-60.

Kahan BD. Transplantation timeline, mankind's three millennia – one maverick's three decades in the struggle against biomedical individuality. *Transplantation* 1991; 51 (1): 1-21.

Kallio EA, Lemström KB, Häyry PJ, Ryan US, Koskinen PK. Blockade of complement inhibits obliterative bronchiolitis in rat tracheal allografts. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1332-9.

Kalman VK, Klimpel GR. Cyclosporin A inhibits the production of gamma interferon (IFN gamma), but does not inhibit production of virus-induced IFN alpha/beta. *Cell Immunol* 1983; 78 (1): 122-9.

Kasaian MT, Whitters MJ, Carter LL, Lowe LD, Jussif JM, Deng B, Johnson KA, Witek JS, Senices M, Konz RF, Wurster AL, Donaldson DD, Collins M, Young DA, Grusby MJ. IL-21 limits NK cell responses and promotes antigen-specific T cell activation: a mediator of the transition from innate to adaptive immunity. *Immunity* 2002; 16 (4): 559-69.

Kauppinen H, Soots A, Krogerus L, Loginov R, Holma K, Ahonen J, Lautenschlager I. Sequential analysis of adhesion molecules and their ligands in rat renal allografts during the development of chronic rejection. *Transpl Int* 2000; 13 (4): 247-54.

Kawana K, Takahashi M, Kushida K, Hoshino H, Sakata S, Inoue T. The effect of cyclosporin A administration on bone metabolism in the rat evaluated by biochemical markers. *J Endocrinol Invest* 1996; 19 (8): 499-504.

Kawauchi M, Gundry SR, de Begona JA, Razzouk AJ, Bouchart F, Fukushima N, Hauck AJ, Weeks DA, Nehlsen-Cannarella S, Bailey LL. Prolonged survival of orthotopically transplanted heart xenograft in infant baboons. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 106 (5): 779-86.

Kelly PA, Gruber SA, Behbod F, Kahan BD. Sirolimus, a new, potent immunosuppressive agent. *Pharmacotherapy* 1997; 17 (6): 1148-56.

Kennedy GA, Kay TD, Johnson DW, Hawley CM, Campbell SB, Isbel NM, Marlton P, Cobcroft R, Gill D, Cull G. Neutrophil dysplasia characterised by a pseudo-Pelger-Huet anomaly occurring with the use of mycophenolate mofetil and ganciclovir following renal transplantation: a report of five cases. *Pathology* 2002; 34 (3): 263-6.

Keogh A, Macdonald P, Mundy J, Chang V, Harvison A, Spratt P. Five-year follow-up of a randomized double-drug versus triple-drug therapy immunosuppressive trial after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1992; 11 (3 Pt 1): 550-5; discussion 556.

Keown PA. Molecular and clinical therapeutics of cyclosporine in transplantation. Dans Ginns LC, Cosimi AB, Morris PJ, Eds. *Immunosuppression in Transplantation*. Blackwell Science, 1999.

Khan WN. Regulation of B lymphocyte development and activation by Bruton's tyrosine kinase. *Immunol Res* 2001; 23 (2-3): 147.

Khanna A, Li B, Stenzel KH, Suthanthiran M. Regulation of new DNA synthesis in mammalian cells by cyclosporine. Demonstration of a transforming growth factor beta-dependent mechanism of inhibition of cell growth. *Transplantation* 1994; 57 (4): 577-82.

Khanna AK, Cairns VR, Becker CG, Hosenpud JD. Transforming growth factor (TGF)-beta mimics and anti-TGF-beta antibody abrogates the in vivo effects of cyclosporine: demonstration of a direct role of TGF-beta in immunosuppression and nephrotoxicity of cyclosporine. *Transplantation* 1999; 67 (6): 882-9.

Khor SP, McCarthy K, Dupont M, Murray K, Timony G. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, allometry, and dose selection of rPSGL-Ig for phase I trial. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293 (2): 618-24.

Kim HS, Raskova J, Degiannis D, Risk KJ. Effects of cyclosporine and rapamycin on immunoglobulin production by preactivated human B cells. *Clin Exp Immunol* 1994; 96: 508-12.

Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M. FK506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biochemical characteristics. *J Antibiot* 1987; 40: 1249-55.

Kirk AD, Burkly LC, Batty DS, Baumgartner RE, Berning JD, Buchanan K, Fechner JH Jr, Germond RL, Kampen RL, Patterson NB, Swanson SJ, Tadaki DK, TenHoor CN, White L, Knechtle SJ, Harlan DM. Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates. *Nat Med* 1999; 5 (6): 686-93.

Kirken RA, Wang YL. Molecular actions of sirolimus: sirolimus and mTor. *Transplant Proc* 2003; 35 (3 Suppl): S227-30.

Kirklin JK, Bourge RC, Naftel DC, Morrow WR, Deierhoi MH, Kauffman RS, White-Williams C, Nomberg RI, Holman WL, Smith DC Jr. Treatment of recurrent heart rejection with mycophenolate mofetil (RS-61443): initial clinical experience. *J Heart Lung Transplant* 1994; 13 (3): 444-50.

Kirschfink M. Controlling the complement system in inflammation. *Immunopharmacology* 1997; 38 (1-2): 51-62.

Kissmeyer-Nielsen F, Olsen S, Petersen VP, Fjeldborg O. Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet* 1966; 2 (7465): 662-5.

Klee CB, Crouch TH, Krinks MH. Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76 (12): 6270-3.

Klintmalm GB, Ascher NL, Busuttil RW, Deierhoi M, Gonwa TA, Kauffman R, McDiarmid S, Poplawski S, Sollinger H, Roberts J. RS-61443 for treatment-resistant human liver rejection. *Transplant Proc* 1993; 25 (1 Pt 1): 697.

Klupp J, Morris RE. Nonbiologics. Dans Norman DJ, Turka LA, Eds. *Primer on Transplantation*, Second Edition, American Society of Transplantation, 2001.

Knecht W, Loffler M. Species-related inhibition of human and rat dihydroorotate dehydrogenase by immunosuppressive isoxazol and cinchoninic acid derivatives. *Biochem Pharmacol* 1998; 56: 1259-64.

Knight R, Ferrareso M, Serino F, Katz S, Lewis R, Kahan BD. Low-dose rapamycin

potentiates the effects of subtherapeutic doses of cyclosporine to prolong renal allograft survival in the mongrel canine model. *Transplantation* 1993; 55 (4): 947-9.

Kobashigawa JA. Physiology of the transplanted heart. Dans Norman DJ, Turka LA, Eds. *Primer on Transplantation*, Second Edition, American Society of Transplantation, 2001.

Koletsky AJ, Harding MW, Handschumacher RE. Cyclophilin: distribution and variant properties in normal and neoplastic tissues. *J Immunol* 1986; 137 (3): 1054-9.

Koo DD, Welsh KI, Roake JA, Morris PJ, Fuggle SV. Ischemia/reperfusion injury in human kidney transplantation: an immunohistochemical analysis of changes after reperfusion. *Am J Pathol* 1998; 153 (2): 557-66.

Korczak-Kowalska G, Durlik M, Wierzbicki P, Wyzgal J, Lis-Lachowicz K, Morzycka-Michalik M, Mrowiec T, Nowaczyk M., Gorski A. Lymphocyte adhesion molecules in renal allograft rejection. *Transplant Proc* 1996; 28 (6): 3437.

Korom S, Hancock WW, Coito AJ, Kupiec-Weglinski JW. Blockade of very late antigen-4 integrin binding to fibronectin in allograft recipients. II. Treatment with connecting segment-1 peptides prevents chronic rejection by attenuating arteriosclerotic development and suppressing intragraft T cell and macrophage activation. *Transplantation* 1998; 65 (6): 854-9.

Kosaka H, Yoneyama H, Zhang L, Fujii S, Yamamoto A, Igarashi J. Induction of LOX-1 and iNOS expressions by ischemia-reperfusion of rat kidney and the opposing effect of L-arginine. *FASEB J* 2003; 17 (6): 636-43.

Koser PL, Eng WK, Bossard MJ, McLaughlin MM, Cafferkey R, Sathe GM, Faucette L,

Koskinen P. K., Lemström K. B. Adhesion molecule p-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 in enhanced heart allograft arteriosclerosis in the rat. *Circulation* 1997; 95: 191-6.

Kreis H, Cisterne JM, Land W, Wramner L, Squifflet JP, Abramowicz D, Campistol JM, Morales JM, Grinyo JM, Mourad G, Berthoux FC, Brattstrom C, Lebranchu Y, Vialtel P. Sirolimus in association with mycophenolate mofetil induction for the prevention of acute graft rejection in renal allograft recipients. *Transplantation* 2000; 69 (7): 1252-60.

Krensky AM, Weiss A, Crabtree G, Davis MM, Parham P. T-lymphocyte-antigen interactions in transplant rejection. *N Engl J Med* 1990; 322 (8): 510-7.

Krensky AM. Immune response to allografts. Dans Norman DJ, Turka LA, Eds. *Primer on Transplantation*, Second edition, American Society of Transplantation, 2001.

Krieger NR, Yin DP, Fathman CG. CD4⁺ but not CD8⁺ cells are essential for allojection. *J Exp Med* 1996; 184 (5): 2013-8.

Krishnadasan B, Naidu B, Rosengart M, Farr AL, Barnes A, Verrier ED, Mulligan MS. Decreased lung ischemia-reperfusion injury in rats after preoperative administration of Cyclosporine and Tacrolimus. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 123 (4): 756-67.

Krishnaswamy G, Kelley J, Yerra L, Smith JK, Chi DS. Human Endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19: 91-104.

Kronke M, Leonard WJ, Depper JM, Arya SK, Wong-Staal F, Gallo RC, Waldmann TA, Greene WC. Cyclosporin A inhibits T-cell growth factor gene expression at the level of mRNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81 (16): 5214-8.

Kumar MS, White AG, Alex G, Antos MS, Philips EM, Abouna GM. Correlation of blood levels and tissue levels of cyclosporine with the histologic features of cyclosporine toxicity. *Transplant Proc* 1988; 20 (2 Suppl 2): 407-13.

Kuo EA, Hambleton P, Kay DP, Evans PL, Matharu SS, Little E, McDowall N, Jones CB, Hedgecock CJR, Yea CM, Chan AWE, Hairsine PW, Ager IR, Tully WR, Williamson RA, Westwood R. Synthesis, structure-activity relationships, and pharmacokinetic properties of dihydroorotate dehydrogenase inhibitors: 2-cyano-3-cyclopropyl-3-hydroxy-N-[3'-methyl-4'(trifluoromethyl)phenyl]propenamide and related compounds. *J Med Chem* 1996; 39: 4608-21.

Kurkijarvi R, Jalkanen S, Isoniemi H, Salmi M. Vascular adhesion protein-1 (VAP-1) mediates lymphocyte-endothelial interactions in chronic kidney rejection. *Eur J Immunol* 2001; 31 (10): 2876-84.

Kurosaki T. Genetic analysis of B cell antigen receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 555-92.

Kurrle R, Ruuth E, Bartlett R, Lauffer L, Schorlemmer HU. Malononitrilamides inhibit T- and B-cell responsiveness in different species. *Transplant Proc* 1997; 29 (1-2): 1302-3.

Kusaka M, Zandi-Nejad K, Kato S, Beato F, Nagano H, Shaw GD, Tilney NL. Exploitation of the continuum between early ischemia/reperfusion injury and host alloresponsiveness: indefinite kidney allograft survival by treatment with a soluble P-selectin ligand and low-dose cyclosporine in combination. *Transplantation* 1999; 67 (9): 1255-61.

Kvanta A, Kontny E, Jondal M, Okret S, Fredholm BB. Mitogen stimulation of T-cells increases c-Fos and c-Jun protein levels, AP-1 binding and AP-1 transcriptional activity. *Cell Signal* 1992; 4 (3): 275-86.

Kyles AE, Gregory CR, Griffey SM, Bernstein L, Jackson J, Morris RE. Leflunomide analog, MNA-715, plus cyclosporine reduces renal allograft rejection in mismatched dogs. *Transplant Proc* 2001; 33 (1-2): 368.

Kyles AE, Gregory CR, Griffey SM, Bernstein L, Pierce J, Lilja HS, Morris RE. Immunosuppression with a combination of the leflunomide analog, FK778, and microemulsified cyclosporine for renal transplantation in mongrel dogs. *Transplantation* 2003; 75 (8): 1128-33.

Kyles AE, Gregory CR, Griffey SM, Jackson J, Bernstein L, Morris RE. An evaluation of combined immunosuppression with MNA 715 and microemulsified cyclosporine on renal allograft rejection in mismatched mongrel dogs. *Vet Surg* 2002; 31 (4): 358-66.

Kyriakides C, Favuzza J, Wang Y, Austen WG Jr, Moore FD Jr, Hechtman HB. Recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand 1 moderates local and remote injuries following experimental lower-torso ischaemia. *Br J Surg* 2001; 88 (6): 825-30.

Lagoo A.S., Buckley P.J., Burchell L.J., Peters D., Fechner J.H., Tsuchida M., Dong Y., Hong X., Brunner K.G., Oberley T.D., Hamawy M.M., Knechtle S.J., 2000. Increased glomerular deposits of von willerbrand factor in chronic but not acute, rejection of primate renal allografts. *Transplantation*, 70(6): 877-886.

Lahlou A, Peraldi MN, Thervet E, Flahault A, Delarue F, Soubrier F, Rossert J, Hertig A, Rondeau E. Chronic graft dysfunction in renal transplant patients: potential role of plasminogen activator inhibitor type 1. *Transplantation* 2002; 73 (8): 1290-5.

Lai JH, Tan H. CD28 signaling causes a sustained down-regulation of I kappa B alpha which can be prevented by the immunosuppressant rapamycin. *J Biol Chem* 1994; 269: 30077-80.

Langrehr JM, Dull KE, Ochoa JB, Billiar TR, Ildstad ST, Schraut WH, Simmons RL, Hoffman RA. Evidence that nitric oxide production by in vivo allosensitized cells inhibits the development of allospecific CTL. *Transplantation* 1992; 53 (3): 632-40.

Larsen CP, Alexander DZ, Hendrix R, Ritchie SC, Pearson TC. Fas-mediated cytotoxicity. An immunoeffector or immunoregulatory pathway in T cell-mediated immune responses? *Transplantation* 1995; 60 (3): 221-4.

Larsen CP, Austyn JM, Morris PJ. The role of graft-derived dendritic leukocytes in the rejection of vascularized organ allografts. Recent findings on the migration and function of dendritic leukocytes after transplantation. *Ann Surg* 1990; 212 (3): 308-15; discussion 316-7.

Laskow DA, Deierhoi MH, Hudson SL, Orr CL, Curtis JJ, Diethelm AG. The incidence of subsequent acute rejection following the treatment of refractory renal allograft rejection with mycophenolate mofetil (RS61443). *Transplantation* 1994; 57 (4): 640-3.

Lassila M. Interaction of cyclosporine A and the renin-angiotensin system; new perspectives. *Curr Drug Metab* 2002; 3 (1): 61-71.

Lautenschlager I, Soots A, Krogerus L, Kauppinen H, Saarinen O, Bruggeman C, Ahonen J. Effect of cytomegalovirus on an experimental model of chronic renal allograft rejection under triple-drug treatment in the rat. *Transplantation* 1997, 64(3): 391-8.

Le Bouteiller PP, Mishal Z, Lemonnier FA, Kourilsky FM. Quantification by flow cytometry of HLA class I molecules at the surface of murine cells transformed by cloned HLA genes. *J Immunol Methods* 1983; 61 (3): 301-15.

Le Moine A, Goldman M, Abramowicz D. Multiple pathways to allograft rejection. *Transplantation* 2002; 73 (9): 1373-81.

Leaker B, Cairns HS. Clinical aspects of cyclosporin nephrotoxicity. *Br J Hosp Med* 1994; 52 (10): 529-34.

Lee S, Tung KS, Koopmans H, Chandler JG, Orloff MJ. Pancreaticoduodenal transplantation in the rat. *Transplantation* 1972; 13 (4): 421-5.

Lee WA, Gu L, Miksztal AR, Chu N, Leung K, Nelson PH. Bioavailability improvement of mycophenolic acid through amino ester derivatization. *Pharm Res* 1990; 7 (2): 161-6.

Lemasters JJ. Mechanisms of hepatic toxicity V. necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol* 1999; 39: G1-6.

Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*; 14:233-58.

Levy GA. C₂ monitoring strategy for optimizing cyclosporin immunosuppression from the Neoral[®]1 formulation. *Bio Drugs* 2001; 15 (5): 279-90.

Levy MA, Johnson RK, Bergsma DJ, et al. The tyrosine⁸⁹ residue of yeast FKBP12 is required for rapamycin binding. *Gene* 1993; 129 (2): 159-65.

Li XC, Demirci G, Ferrari-Lacraz S, Groves C, Coyle A, Malek TR, Strom TB. IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo. *Nat Med* 2001; 7 (1): 114-8.

Li XC, Roy-Chaudhury P, Hancock WW, Manfro R, Zand MS, Li Y, Zheng XX, Nickerson PW, Steiger J, Malek TR, Strom TB. IL-2 and IL-4 double knockout mice reject islet allografts: a role for novel T cell growth factors in allograft rejection. *J Immunol* 1998; 161 (2): 890-6.

Li XC, Strom TB. Mechanisms of tolerance. Dans Norman DJ, Turka LA, Eds. *Primer on Transplantation, Second Edition*, American Society of Transplantation, 2001.

Li XC, Strom TB. T-cell growth factors and the allograft response. *Curr Opin Organ Transplant* 2003; 8: 19-24.

Li XC, Zheng XX, Zand MS, Li Y, Strom TB. IL-2 dependent rapamycin resistant signals are required for tolerance induction and T cell apoptosis. *Transplantation* 1998; 65: S169.

Light SE, Ettenger RB. Investigational immunosuppressive agents: biological. Dans Norman DJ, Turka LA, Eds. *Primer on Transplantation, Second Edition*, American Society of Transplantation, 2001.

Lin Y, Segers C, Waer M. Efficacy of the malononitrilamide X 920715 as compared with leflunomide in cardiac allo- and xenotransplantation in rats. *Transplant Proc* 1996; 28 (6): 3036.

Lindner JK, Zantl N. Synergism of the malononitrilamides 279 and 715 with cyclosporine A in the induction of long-term cardiac allograft survival. *Transpl Int* 1998; 11 Suppl 1: S303-9.

Lindquist RR, Guttmann RD, Merrill JP. Renal transplantation in the inbred rat. II. An immunohistochemical study of acute allograft rejection. *Am J Pathol* 1968b; 52 (3): 531-45.

Lindquist RR, Guttmann RD, Merrill JP. Renal transplantation in the inbred rat. V. Histochemical studies of acute renal allograft rejection. *Am J Pathol* 1968a; 52 (6): 1145-68.

Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991; 66 (4): 807-15.

Lombardi G, Sidhu S, Daly M, Batchelor JR, Makgoba W, Lechler RI. Are primary alloresponses truly primary? *Int Immunol* 1990; 2 (1): 9-13.

Lu X, Schuurman HJ, Borel JF. Effect of rapamycin on islet xenograft survival. *Transplant Proc* 1994; 26 (3): 1128-9.

Luo H, Chen H, Daloze P, Chang JY, St-Louis G, Wu J. Inhibition of in vitro immunoglobulin production by rapamycin. *Transplantation* 1992; 53 (5): 1071-6.

Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994; 171, 131-7.

Ma A, Chen H. Small molecule immunosuppressive agents in experimental and clinical transplantation. *Current Drug Targets – Cardiovas Haemat Dis* 2002; 2: 57-71.

Ma W, Pober JS. Human endothelial cells effectively costimulate cytokine production by, but not differentiation of, naive CD4⁺ T cells. *J Immunol* 1998; 161 (5): 2158-67.

MacDonald AS, Ed. *A Guide to the Clinical Use of Tacrolimus for Transplant Professionals*, Second Edition, Fujisawa Canada, 2001.

MacDonald AS; The RAPAMUNE Global Study Group. A worldwide, phase III, randomized, controlled, safety and efficacy study of a sirolimus/cyclosporine regimen for prevention of acute rejection in recipients of primary mismatched renal allografts. *Transplantation* 2001; 71 (2): 271-80.

Mahajan S, Ghosh S, Sudbeck EA, Zheng Y, Downs S, Hupke M, Uckun FM. Rational design and synthesis of a novel anti-leukemic agent targeting Bruton's tyrosine kinase (BTK), LFM-A13 [α -cyano- β -methyl-*N*-(2,5-dibromophenyl) Propenamide]. *J Biol Chem* 1999; 274 (14): 9587-99.

Mahoney RJ, Taranto S, Edwards E. B-Cell crossmatching and kidney allograft outcome in 9031 United States transplant recipients. *Hum Immunol* 2002; 63 (4): 324-35.

Majoer GD, Van Breda Vriesman PJ. Role of antibody in rat renal allograft rejection. II. Failure to enhance renal allografts by sensitization to donor class I antigens presented by donor strain erythrocytes. *Transplantation* 1983; 35 (2): 121-6.

Maki T, Sakai A, Pettirossi O, Kountz SL. En bloc transplantation of the liver, pancreas, duodenum, spleen, and kidney in the rat. *Transplantation* 1977; 24 (4): 256-62.

Makowka L, Chapman F, Qian S, Zerbe A, Lee PH, Murase N, Saunders R, Todo S, Starzl TE. The effect of FK-506 on hyperacute rejection in presensitized rats. *Transplant Proc* 1987; 19 (5 Suppl 6): 79-83.

Manez R, Jain A, Marino IR. Comparative evaluation of tacrolimus (FK506) and cyclosporin A as immunosuppressive agents. *Transplant Rev* 1995; 9 (2): 63.

Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Leflunomide suppresses TNF-induced cellular responses: effects on NF-kappa B, activator protein-1, c-Jun N-terminal protein kinase, and apoptosis. *J Immunol* 2000; 165 (10): 5962-9.

Manneschi LI, Formigli L, Tani A, Perna AM, Orlandini SZ. Ultrastructural evidence of myocardial alterations in the course of heterotopic heart transplantation. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1996; 28 (3): 401.

Mardini M, Mihailidou AS, Wong A, Rasmussen HH. Cyclosporine and FK506 differentially regulate the sarcolemmal Na(+)-K(+) pump. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 297 (2): 804-10.

Margreiter R. European Tacrolimus vs Ciclosporin Microemulsion Renal Transplantation Study Group. Efficacy and safety of tacrolimus compared with ciclosporin microemulsion in renal transplantation: a randomised multicentre study. *Lancet* 2002; 359 (9308): 741-6.

Mark W, Hechenleitner P, Dietze O, Klima G, Schneeberger S, Steurer W, Candinas D, Margreiter R, Konigsrainer A. Duodenal histology for monitoring treatment of acute rejection in pancreaticoduodenal allografts in rats. *Transplantation* 2002; 73 (2): 198-203.

Marra F. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d1899-914.

Martelius T, Krogerus L, Hockerstedt K, Bruggeman C, Lautenschlager I. Cytomegalovirus infection is associated with increased inflammation and severe bile duct damage in rat liver allografts. *Hepatology* 1998; 27: 996-1002.

Marx SO, Jyaraman T, Go LO, Marks AR. Rapamycin-FKBP inhibit cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cell. *Circ Res* 1995; 76: 412-7.

Mason J. The effect of cyclosporin on renal function. *J Autoimmun* 1992; 5 Suppl A: 349-54.

Mathew TH. A blinded, long-term, randomized multicenter study of mycophenolate mofetil in cadaveric renal transplantation: results at three years. Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group. *Transplantation* 1998; 65 (11): 1450-4.

Matturri L, Ghidoni P, Palazzi P, Stasi P. Renal allograft rejection: immunohistochemistry of inflammatory cellular subsets and vascular lesions. *Basic Appl Histochem* 1986; 30 (2): 267-77.

McAlister VC, Mahalati K, Peltekian KM, Fraser A, MacDonald AS. A clinical pharmacokinetic study of tacrolimus and sirolimus combination immunosuppression comparing simultaneous to separated administration. *Ther Drug Monit* 2002; 24 (3): 346-50.

McAlister VC, Peltekian KM, Malatjalian DA, Colohan S, MacDonald S, Bitter-Suermann H, MacDonald AS. Orthotopic liver transplantation using low-dose tacrolimus and sirolimus. *Liver Transpl* 2001; 7 (8): 701-8.

McAnulty JF. The effect of calcium on hypothermia-facilitated resuscitation of warm ischemic kidney tissue slices: a role for the mitochondrial permeability transition pore? *Cryobiology* 1998; 36 (1): 12-9.

McEver RP, Cummings RD. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest* 1997; 100 (3): 485-91.

McKenzie FN, Tadros N, Stiller C, Keown P, Sinclair N, Kostuk W. Influence of donor-recipient lymphocyte crossmatch and ABO status on rejection risk in cardiac transplantation. *Transplant Proc* 1987; 19 (4): 3439-41.

McKenzie IF, Stocker J, Ting A, Morris PJ. Human lymphocytotoxic and haemagglutinating activity against sheep and pig cells. *Lancet* 1968; 2 (7564): 386-7.

McMaster P, Procyshyn A, Calne RY, Valdes R, Rolles K, Smith DJ. Prolongation of canine pancreas allograft survival with cyclosporin A: preliminary report. *Br Med J* 1980; 280 (6212): 444-5.

Meade J, Fernandez C, Turner M. The tyrosine kinase Lyn is required for B cell development beyond the T1 stage in the spleen: rescue by over-expression of Bcl-2. *Eur J Immunol* 2002; 32 (4): 1029-34.

Meade JW, Linton RR, Darling RC, Menendez CV. Arterial homografts. A long-term clinical follow-up. *Arch Surg* 1966; 93 (3): 392-9.

Meier-Kriesche HU, Kaplan B. Toxicity and efficacy of sirolimus: relationship to whole-blood concentrations. *Clin Ther* 2000; 22 Suppl B:B93-100.

Meier-Kriesche HU, Vaghela M, Thambuganipalle R, Friedman G, Jacobs M, Kaplan B. The effect of body mass index on long-term renal allograft survival. *Transplantation* 1999; 68 (9): 1294-7.

Merkenschlager M, Ikeda H, Wilkinson D, Beverly PC, Trowsdale J, Fisher AG, Altmann DM. Allorecognition of HLA-DR and -DQ transfectants by human CD45RA and CD45RO CD4 T cells: repertoire analysis and activation requirements. *Eur J Immunol* 1991; 21 (1): 79-88.

Miller LW. Action, efficacy and toxicities: tacrolimus. Dans Norman DJ, Turka LA, Eds. *Primer on Transplantation, Second Edition*, American Society of Transplantation, 2001.

Miller RW, Kerr CT. Dihydroorotate dehydrogenase. 3. Interactions with substrates, inhibitors, artificial electron acceptors, and cytochrome c. *J Biol Chem* 1966; 241 (23): 5597-604.

Minanov OP, Kwiatkowski P, Popilskis S, Michler RE. Modified technique for heterotopic heart transplantation in small primates. *Ann Thorac Surg* 1997; 63: 258-60.

Molnar-Kimber KL. Mechanism of action of rapamycin (sirolimus, rapamycin). *Transplant Proc* 1996; 28: 964.

Molossi S, Rabinovitch M. VLA-4 and lymphocyte trafficking in immune-inflammatory states: novel therapeutic approaches in allograft arteriopathy. *Springer Semin Immunopathol.* 1995; 16 (4): 443-65.

Monden M, Gotoh M, Kanai T, Valdivia LA, Umeshita K, Endoh W, Nakano Y, Kawai M, Ohzato H, Ukei T, et al. A potent immunosuppressive effect of FK 506 in orthotopic liver transplantation in primates. *Transplant Proc* 1990; 22 (1): 66-71.

Moore KL, Patel KD, Bruehl RE, Li F, Johnson DA, Lichenstein HS, Cummings RD, Bainton DF, McEver RP. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol* 1995; 128: 661-671.

Moore S. Responses of the arterial wall to injury. *Diabetes* 1981; 30 (Suppl 2): 8-13.

Morice WG, Wiederrecht G, Brunn GJ, Siekierka JJ, Abraham RT. Rapamycin inhibition of interleukin-2-dependent p33cdk2 and p34cdc2 kinase activation in T lymphocytes. *J Biol Chem* 1993; 268 (30): 22737-45.

Morris RE, Hoyt EG, Murphy MP, Eugui EM, Allison AC. Mycophenolic acid morpholinoethylester (RS-61443) is a new immunosuppressant that prevents and halts heart allograft rejection by selective inhibition of T- and B-cell purine synthesis. *Transplant Proc* 1990; 22 (4): 1659-62.

Morris RE, Hoyt EG, Murphy MP, Eugui EM, Allison AC. Mycophenolic acid morpholinoethylester (RS-61443) is a new immunosuppressant that prevents and halts heart allograft rejection by selective inhibition of T- and B-cell purine synthesis. *Transplant Proc* 1990; 22 (4): 1659-62.

Morris RE, Meiser M. Identification of a new pharmacologic action for an old compound. *Med Sci Res* 1989; 17: 609.

Morris RE, Wang J, Blum JR, Flavin T, Murphy MP, Almquist SJ, Chu N, Tam YL, Kaloostian M, Allison AC, et al. Immunosuppressive effects of the morpholinoethyl ester of mycophenolic acid (RS-61443) in rat and nonhuman primate recipients of heart allografts. *Transplant Proc* 1991; 23 (2 Suppl 2): 19-25.

Morris RE. Dans Norman DJ, Suki WN, Eds. Primer on Transplantation. The American Society of Transplant Physician, 1998.

Morris RE. Mechanisms of action of new immunosuppressive drugs. *Kidney Int* 1996; 49 (suppl. 53): S26-38.

Morris RE. Rapamycins: antifungal, antitumor, antiproliferative, and immunosuppressive macrolide. *Transplant Rev* 1992; 6 : 39.

Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-73.

Mottram PL, Smith JA, Mason A, Mirisklavos A, Dumble LJ, Clunie GJ. Electrocardiographic monitoring of cardiac transplants in mice. *Cardiovasc Res* 1988; 22: 315-21.

Mueller C, Shao Y, Altermatt HJ, Hess MW, Shelby J. The effect of cyclosporine treatment on the expression of genes encoding granzyme A and perforin in the infiltrate of mouse heart transplants. *Transplantation* 1993; 55 (1): 139-45.

Muller WA. The role of PECAM-1 (CD31) in leukocyte emigration: studies in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol* 1995; 57 (4): 523-8.

Murase N, Demetris AJ, Tanabe M, Miyazawa H, Valdivia LA, Nakamura K, Starzl TE. Effect of FK 506 and antiproliferative agents for heart and liver xenotransplantation from hamster to rat. *Transplant Proc* 1993; 25 (1 Pt 1): 425-6.

Murase N, Kim DG, Todo S, Cramer DV, Fung J, Starzl TE. FK506 suppression of heart

and liver allograft rejection. II: The induction of graft acceptance in rats. *Transplantation* 1990b; 50 (5): 739-44.

Murase N, Kim DG, Todo S, Cramer DV, Fung JJ, Starzl TE. Suppression of allograft rejection with FK506. I. Prolonged cardiac and liver survival in rats following short-course therapy. *Transplantation* 1990a; 50 (2): 186-9.

Murphy GP, Weber HW, Brede HD, Retief FP, Retief CP, Van Zyl JA, Groenerwald JH, Van Zyl JJ. The significance of human ABO blood groups in the survival of Untreated baboon renal allotransplants. *Am Surg* 1969; 35 (4): 292-300.

Mycophenolate Mofetil Acute Renal Rejection Study Group. Mycophenolate mofetil for the treatment of a first acute renal allograft rejection: three-year follow-up. The Mycophenolate Mofetil Acute Renal Rejection Study Group. *Transplantation* 2001; 71 (8): 1091-7.

Myers DD Jr, Henke PK, Wroblewski SK, Hawley AE, Farris DM, Chapman AM, Knipp BS, Thanaporn P, Schaub RG, Greenfield LJ, Wakefield TW. P-selectin inhibition enhances thrombus resolution and decreases vein wall fibrosis in a rat model. *J Vasc Surg* 2002; 36 (5): 928-38.

Nadler SG, Eversole AC, Tepper MA, Cleaveland JS. Elucidating the mechanism of action of the immunosuppressant 15-deoxyspergualin. *Ther Drug Monit* 1995; 17 (6): 700-3.

Nagano H, Nadeau KC, Takada M, Kusaka M, Tilney NL. Sequential cellular and molecular kinetics in acutely rejecting renal allografts in rats. *Transplantation* 1997; 63 (8): 1101-8.

Nevala WK, Paul C, Wettstein PJ. Immunodominant minor histocompatibility antigen peptides recognized by cytolytic T lymphocytes primed by indirect presentation. *Transplantation* 1998; 65 (4): 559-69.

Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 1989; 17 (7): 2503-16.

Nickeleit V, Vamvakas EC, Pascual M, Poletti BJ, Colvin RB. The prognostic significance of specific arterial lesions in acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9 (7): 1301-8.

Nore BF, Vargas L, Mohamed AJ, Branden LJ, Backesjo CM, Islam TC, Mattsson PT, Hultenby K, Christensson B, Smith CI. Redistribution of Bruton's tyrosine kinase by activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Rho-family GTPases. *Eur J Immunol* 2000; 30 (1): 145-54.

Norman DJ. Clinical immunogenetics. Dans Norman DJ, Turka LA, Eds. *Primer on Transplantation*, Second Edition, American Society of Transplantation, 2001a.

Norman DJ. Action, efficacy and toxicities: anti-CD3 monoclonal antibodies. Dans Norman DJ, Turka LA, Eds. *Primer on Transplantation*, Second Edition, American Society of Transplantation, 2001b.

Norman KE, Moore KL, McEver RP, Ley K. Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand 1. *Blood* 1995; 86: 4417-21.

Ochiai T, Nakajima K, Nagata M, Hori S, Asano T, Isono K. Studies of the induction and

maintenance of long-term graft acceptance by treatment with FK506 in heterotopic cardiac allotransplantation in rats. *Transplantation* 1987; 44 (6): 734-8.

Ode-Hakim S, Docke WD, Kern F, Emmrich F, Volk HD, Reinke P. Delayed-type hypersensitivity-like mechanisms dominate late acute rejection episodes in renal allograft recipients. *Transplantation* 1996; 61 (8): 1233-40.

Oerkermann H, Hirschmann WD, Gross R. Studies on the novo synthesis of nucleic acids in stimulated human lymphocytes. *Klin Wochenschr* 1973 May 1;51(9):471-3.

O'Grady JG, Burroughs A, Hardy P, Elbourne D, Truesdale A; The UK and Republic of Ireland Liver Transplant Study Group. Tacrolimus versus microemulsified ciclosporin in liver transplantation: the TMC randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360 (9340): 1119-25.

O'Hair DP, McManus RP, Komorowski R. Inhibition of chronic vascular rejection in primate cardiac xenografts using mycophenolate mofetil. *Ann Thorac Surg* 1994; 58 (5): 1311-5.

Ono K, Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1969; 57: 225.

Opal SM, Sypek JP, Keith JC Jr, Schaub RG, Palardy JE, Parejo NA. Evaluation of the safety of recombinant P-selectin glycoprotein ligand-immunoglobulin G fusion protein in experimental models of localized and systemic infection. *Shock* 2001; (4): 285-90.

Opelz G. Effect of HLA matching in heart transplantation. Collaborative Heart Transplant Study. *Transplant Proc* 1989; 21 (1 Pt 1): 794-6.

Orosz CG. Considerations regarding the contributions of B cells to chronic allograft rejection in experimental animal models. *J Heart Lung Transplant* 2000; 19 (7): 634-7.

Oz HS, Hughes WT, Varilek G. Provocative effects of the immunosuppressants rapamycin, tacrolimus, and dexamethasone on pneumonitis in contrast to the anti-pneumonitis effects of mycophenolate mofetil. *Transplantation* 2001 Oct 27;72(8):1464-5.

Page JD, Chaney SG, Hall IH, Lee KH, Holbrook DJ. Inhibition of inosine monophosphate dehydrogenase by sesquiterpene lactones. *Biochim Biophys Acta* 1987; 926 (2): 186-94.

Paine MF, Leung LY, Lim HK, Liao K, Oganesian A, Zhang MY, Thummel KE, Watkins PB. Identification of a novel route of extraction of sirolimus in human small intestine: roles of metabolism and secretion. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 301 (1): 174-86.

Pan F, Ebbs A, Wynn C, Erickson L, Jang MS, Crews G, Fisniku O, Kobayashi M, Paul LC, Benediktsson H, Jiang AH. FK778, a powerful new immunosuppressant, effectively reduces functional and histologic changes of chronic rejection in rat renal allografts. *Transplantation* 2003; 75 (8): 1110-4.

Pantenburg B, Heinzl F, Das L, Heeger PS, Valujskikh A. T cells primed by *Leishmania* major infection cross-react with alloantigens and alter the course of allograft rejection. *J Immunol* 2002; 169 (7): 3686-93.

Pattison JM, Krensky AM. New insights into mechanisms of allograft rejection. *Am J Med Sci* 1997; 313 (5): 257-63.

Paul LC, Davidoff A, Paul DW, Benediktsson H, Issekutz TB. Monoclonal antibodies against LFA-1 and VLA-4 inhibit graft vasculitis in rat cardiac allografts. *Transplant Proc* 1993; 25 (1): 813.

Pavlakakis M, Strehlau J, Lipman M, Shapiro M, Maslinski W, Strom TB. Intragraft IL-15 transcripts are increased in human renal allograft rejection. *Transplantation* 1996; 62 (4): 543-5.

Pawelec G, Wernet P. Cyclosporin A inhibits interleukin 2-dependent growth of alloactivated cloned human T-lymphocytes. *Int J Immunopharmacol* 1983; 5 (4): 315-21.

Perrault LP, Bidouard JP, Janiak P, Villeneuve N, Bruneval P, Vilaine JP, Vanhoutte PM. Time course of coronary endothelial dysfunction in acute untreated rejection after heterotopic heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1997; 16: 643-57.

Pescovitz MD, Govani M. Sirolimus and mycophenolate mofetil for calcineurin-free immunosuppression in renal transplant recipients. *Am J Kidney Dis* 2001; 38 (4 Suppl 2): S16-21.

Pescovitz MD, Thistlethwaite JR Jr, Auchincloss H Jr, Ildstad ST, Sharp TG, Terrill R, Sachs DH. Effect of class II antigen matching on renal allograft survival in miniature swine. *J Exp Med* 1984; 160 (5): 1495-508.

Petcher TJ, Weber H, Ruegger A. Crystal and molecular structure of an iodo-derivative of the cyclic undecapeptide cyclosporin A. *Helv Chim Acta* 1976; 59 (5): 1480-9.

Peters DH, Fitton A, Plosker GL, Faulds D. Tacrolimus. A review of its pharmacology, and therapeutic potential in hepatic and renal transplantation. *Drugs* 1993; 46 (4): 746-94.

Peterson RT, Desai BN, Hardwick JS, Schreiber SL. Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12-rapamycin-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96 (8): 4438-42.

Pettigrew GJ, Lovegrove E, Bradley JA, Maclean J, Bolton EM. Indirect T cell allorecognition and alloantibody-mediated rejection of MHC class I-disparate heart grafts. *J Immunol* 1998; 161 (3): 1292-8.

Peugh WN, Superina RA, Wood KJ, Morris PJ. The role of H-2 and non-H-2 antigens and genes in the rejection of murine cardiac allografts. *Immunogenetics* 1986; 23 (1): 30-7.

Pierce JC, Waller M, Phibbs M. A mixed antiglobulin test with kidney cells in suspension for IgG antibody in human allograft recipients. *Transplantation* 1975; 19 (4): 343-8.

Pietra BA, Wiseman A, Bolwerk A, Rizeq M, Gill RG. CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II. *J Clin Invest* 2000; 106 (8): 1003-10.

Pirsch JD, Sollinger HW. Mycophenolate mofetil--clinical and experimental experience. *Ther Drug Monit* 1996; 18 (4): 357-61.

Pirsch JD, Stratta RJ. Pancreas and simultaneous kidney-pancreas transplantation. Dans Norman DJ, Turka LA, Eds. *Primer on Transplantation, Second Edition*, American Society of Transplantation, 2001.

Pirsch JD. Care of the transplant patient. *Clin Symposia* 1998; 50 (1): 1-35.

Platt JL, Saadi S. The role of complement in transplantation. *Mol Immunol* 1999; 36 (13-14): 965-71.

Platz KP, Bechstein WO, Eckhoff DE, Suzuki Y, Sollinger HW. RS-61443 reverses acute allograft rejection in dogs. *Surgery* 1991; 110 (4): 736-41.

Platz KP, Sollinger HW, Hullett DA, Eckhoff DE, Eugui EM, Allison AC. RS-61443--a new, potent immunosuppressive agent. *Transplantation* 1991; 51 (1): 27-31.

Plosker GL, Foster RH. Tacrolimus: A further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. *Drugs* 2000; 59 (2): 323-89.

Poston RS, Billingham M, Hoyt EG, Pollard J, Shorthouse R, Morris RE, Robbins RC. Rapamycin reverses chronic graft vascular disease in a novel cardiac allograft model. *Circulation* 1999 Jul 6;100(1):67-74.

Prakash A, Jarvis B. Leflunomide: a review of its use in active rheumatoid arthritis. *Drugs* 1999 Dec;58(6):1137-64.

Prashar Y, Khanna A, Sehajpal P, Sharma VK, Suthanthiran M. Stimulation of transforming growth factor-beta 1 transcription by cyclosporine. *FEBS Lett* 1995; 358 (2): 109-12.

Pratschke J, Kofla G, Wilhelm MJ, Vergopoulos A, Laskowski I, Shaw GD, Tullius SG, Volk HD, Neuhaus P, Tilney NL. Improvements in early behavior of rat kidney allografts after treatment of the brain-dead donor. *Ann Surg* 2001a; 234 (6): 732-40.

Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, Beato F, Milford EL, Hancock WW, Tilney NL. Accelerated rejection of renal allografts from brain-dead donors. *Ann Surg* 2000; 232(2): 263-71.

Pratschke J, Wilhelm MJ, Laskowski I, Kusaka M, Beato F, Tullius SG, Neuhaus P, Hancock WW, Tilney NL. Influence of donor brain death on chronic rejection of renal transplants in rats. *J Am Soc Nephrol* 2001b; 12 (11): 2474-81.

Preliminary results of a European multicentre trial. Cyclosporin a as sole immunosuppressive agent in recipients of kidney allografts from cadaver donors. *Lancet* 1982; 2 (8289): 57-60.

Przybylowski P, Balogna M, Radovancevic B, Frazier OH, Susskind B, Van Buren C, Katz S, Kahan BD, Kerman R. The role of flow cytometry-detected IgG and IgM anti-donor antibodies in cardiac allograft recipients. *Transplantation* 1999; 67 (2): 258-62.

Qi S, Xu D, Peng J, Vu MD, Wu J, Bekersky I, Fitzsimmons WE, Peets J, Sehgal S, Daloze P, Chen H. Effect of tacrolimus (FK506) and sirolimus (rapamycin) mono- and combination therapy in prolongation of renal allograft survival in the monkey. *Transplantation* 2000; 69 (7): 1275-83.

Qi S, Zhu S, Xu D, Wang X, Ouyang J, Jiang W, Vu MD, Bilolo KK, Ma A, Daloze P, Bekersky I, Fitzsimmons WE, Chen H. Significant prolongation of renal allograft survival by delayed combination therapy of FK778 with tacrolimus in non-human primates. *Transplantation* 2003; 75 (8): 1124-8.

Qi Z, Ekberg H. Malononitrilamides 715 and 279 prolong rat cardiac allograft survival, reverse ongoing rejection, inhibit allospecific antibody production and interact positively with cyclosporin. *Scand J Immunol* 1998; 48 (4): 379-88.

Qi Z, Simanaitis M, Ekberg H. Malononitrilamides and tacrolimus additively prevent acute rejection in rat cardiac allografts. *Transpl Immunol* 1999; 7 (3): 169-75.

Qian T, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in pH-dependent reperfusion injury to rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1997; 273 (6 Pt 1): C1783-92.

Qian Z, Hu W, Liu J, Sanfilippo F, Hruban RH, Baldwin WM 3rd. Accelerated graft arteriosclerosis in cardiac transplants: complement activation promotes progression of lesions from medium to large arteries. *Transplantation* 2001; 72 (5): 900-6.

Québec-Transplant: www.quebec-transplant.qc.ca

Quesniaux VF, Schreier MH, Wenger RM, Hiestand PC, Harding MW, Van Regenmortel MH. Cyclophilin binds to the region of cyclosporine involved in its immunosuppressive activity. *Eur J Immunol* 1987; 17 (9): 1359-65.

Rabb H, Rosen R, Ramirez G. VLA-4 and its ligand: relevance to kidney diseases. *Springer Semin Immunopathol* 1995; 16: 417-25.

Raisanen-Sokolowski A, Glysing-Jensen T, Russell ME. Donor and recipient contributions of ICAM-1 and P-selectin in parenchymal rejection and graft arteriosclerosis: insights from double knockout mice. *Heart Lung Transplant* 1999; 18 (8): 735-43.

Rajewsky MF. In vitro studies of cell proliferation in tumours. II. Characteristics of a standardised in vitro system for the measurement of 3H-thymidine incorporation into tissue explants. *Eur J Cancer* 1965; 1 (3): 281-7.

Ransom JT. Mechanism of action of mycophenolate mofetil. *Ther Drug Monit* 1995; 17 (6): 681-4.

Rao A. NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol Today* 1994; 15 (6): 274-81.

Raymond MA, Mollica L, Vigneault N, Desormeaux A, Chan JS, Filep JG, Hebert MJ. Blockade of the apoptotic machinery by cyclosporin A redirects cell death toward necrosis in arterial endothelial cells: regulation by reactive oxygen species and cathepsin D. *FASEB J* 2003; 17 (3): 515-7.

Reding R, Squifflet JP, Latinne D, De Bruyere M, Pirson Y, Alexandre GP. Early postoperative monitoring of natural anti-A and anti-B isoantibodies in ABO-incompatible living donor renal allografts. *Transplant Proc* 1987; 19 (1 Pt 3): 1989-90.

Reitz BA, Burton NA, Jamieson SW, Bieber CP, Pennock JL, Stinson EB, Shumway NE. Heart and lung transplantation: autotransplantation and allotransplantation in primates with extended survival *J Thorac Cardiovasc Surg* 1980; 80 (3): 360-72.

Ringden O, Groth CG, Lundgren G, Moller E. Prognostic value of HL-A typing and mixed lymphocyte culture tests in kidney transplantations from living related donors. *Scand J Urol Nephrol* 1975; (29 Suppl): 15-8.

Roberts AB, Sporn MB. Transforming growth factor-beta: potential common mechanisms mediating its effects on embryogenesis, inflammation-repair, and carcinogenesis. *Int J Rad Appl Instrum B* 1987; 14 (4): 435-9.

Roberts JP, Lake JR, Hebert M, Nikolai B, Ascher NL, Ferrell LD. Reversal of chronic

rejection after treatment failure with FK506 and RS61443. *Transplantation* 1993; 56 (4): 1021-3.

Rogers NJ, Lechler RI. Allorecognition. *Am J Transplant* 2001; 1 (2): 97-102.

Rolstad B. The role of passenger lymphocytes in rat skin allografts. *Folia Biol (Praha)*; 23 (5): 327-35.

Romero DF, Buchinsky FJ, Rucinski B, Cvetkovic M, Bryer HP, Liang XG, Ma YF, Jee WS, Epstein S. Rapamycin: a bone sparing immunosuppressant? *J Bone Miner Res* 1995; 10 (5): 760-8.

Rose ML, Smith J, Dureau G, Keogh A, Kobashigowa J. Mycophenolate mofetil decreases antibody production after cardiac transplantation. *Heart Lung Transplant* 2002; 21 (2): 282-5.

Rosenberg JC, Broersma RJ, Bullemer G, Mammen EF, Lenaghan R, Rosenberg BF. Relationship of platelets, blood coagulation, and fibrinolysis to hyperacute rejection of renal xenografts. *Transplantation* 1969; 8 (2): 152-61.

Ross J, Dickerson T, Perkins HA. Two techniques to make the lymphocytotoxic crossmatch more sensitive: prolonged incubation and the antiglobulin test. *Tissue Antigens* 1975; 6 (3): 129-36.

Ross R, Raines E, Bowen-Pope D. Growth factors from platelets, monocytes, and endothelium: their role in cell proliferation. *Ann N Y Acad Sci* 1982; 397: 18-24.

Roth D, Colona J, Burke GW, Ciancio G, Esquenazi V, Miller J. Primary immunosuppression with tacrolimus and mycophenolate mofetil for renal allograft recipients. *Transplantation* 1998; 65 (2): 248-52.

Rottenberg H, Wu S. Mitochondrial dysfunction in lymphocyte from old mice: enhanced activation of the permeability transition. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 240: 68-74.

Rouvier E, Luciani MF, Golstein P. Fas involvement in Ca^{2+} -independent T cell-mediated cytotoxicity. *J Exp Med* 1993; 177 (1): 195-200.

Rozman B. Clinical Pharmacokinetics of leflunomide. *Clin Pharmacokinet* 2002; 41 (6): 421-30.

Rush DN, Henry SF, Jeffery JR, Schroeder TJ, Gough J. Histological findings in early routine biopsies of stable renal allograft recipients. *Transplantation* 1994; 57 (2): 208-211.

Ryffel B, Foxwell BM, Gee A, Greiner B, Woerly G, Mihatsch MJ. Cyclosporine--relationship of side effects to mode of action. *Transplantation* 1988; 46 (2 Suppl): 90S-96S.

Rynasiewicz JJ, Sutherland DE, Ferguson RM, Squifflet JP, Morrow CE, Goetz FC, Najarian JS. Cyclosporin A for immunosuppression: observations in rat heart, pancreas, and islet allograft models and in human renal and pancreas transplantation. *Diabetes* 1982; 31 Suppl 4:92-108.

Sabers CJ, Martin MM, Brunn GJ, Williams JM, Dumont FJ, Wiederrecht G, Abraham RT. Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J Biol Chem* 1995; 270 (2): 815-22.

Sadek S, Medina J, Arias M, Sennesael J, Squifflet JP, Vogt B; Neo Int-05 Study group. Short-term combination of mycophenolate mofetil with cyclosporine as a therapeutic option for renal transplant recipients: A prospective, multicenter, randomized study. *Transplantation* 2002; 74 (4): 511-7.

Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 1986; 324 (6093): 163-6.

Sako D, Chang XJ, Barone KM, Camphaussen RT, Cumming DA, Shaw DG. A sulfated peptide segment at the amino terminus of PSGL-1 is critical for P-selectin binding. *Cell* 1993; 83: 323-8.

Sammur IA, Burton K, Balogun E, Sarathchandra P, Brooks KJ, Bates TE, Green CJ. Time-dependent impairment of mitochondrial function after storage and transplantation of rabbit kidneys. *Transplantation* 2000; 69 (7): 1265-75.

Samson M, Aubry F, Parmentier M. Que sont les chimiokines? *Médecine/Sciences* 1999; 15: 966-73.

Sanfilippo F, Baldwin WM. Antibody and complement in graft rejection. *Transplant Proc* 1997; 29 (1-2): 179-80.

Santamaria P, Boyce-Jacino MT, Lindstrom AL, Barbosa JJ, Faras AJ, Rich SS. HLA class II "typing": direct sequencing of DRB, DQB, and DQA genes. *Hum Immunol* 1992; 33 (2): 69-81.

Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med* 1998; 338 (25): 1813-21.

Schattner A, Duggan DB. Natural killer cells--toward clinical application. *Am J Hematol* 1985; 18 (4): 435-43.

Schiff MH, Strand V, Oed C, Loew-Friedrich I. Leflunomide: efficacy and safety in clinical trials for the treatment of rheumatoid arthritis. *Drugs Today* 2000; 36 (6): 383-94.

Schmid C, Heemann U, Azuma H, Tilney NL. Comparison of rapamycin, RS 61443, cyclosporine, and low-dose heparin as treatment for transplant vasculopathy in a rat model of chronic allograft rejection. *Transplant Proc* 1995; 27 (1): 438-9.

Schmidbauer G, Hancock WW, Wasowska B, Badger AM, Kupiec-Weglinski JW. Abrogation by rapamycin of accelerated rejection in sensitized rats by inhibition of alloantibody responses and selective suppression of intragraft mononuclear and endothelial cell activation, cytokine production, and cell adhesion. *Transplantation* 1994; 57 (6): 933-41.

Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 1998; 393 (6684): 480-3.

Schorlemmer HU, Bartlett RR, Kurre R. Malononitrilamides prevent the generation of oxygen radicals in mononuclear phagocytes and graft rejection in a rat model. *Transplant Proc* 1999b; 31 (1-2): 851-3.

Schorlemmer HU, Bartlett RR, Lindner JK, Kurrle R. Coadministration of malononitrilamides and tacrolimus induces tolerance in a rat skin allograft. *Transplant Proc* 1999; 31 (1-2): 1148.

Schorlemmer HU, Bartlett RR, Lindner JK, Kurrle R. Long-term allograft survival and tolerance induction by the synergistic activity of malononitrilamides and tacrolimus. *Transplant Proc* 1998; 30 (8): 4099.

Schorlemmer HU, Bartlett RR, Schleyerbach R. Immunomodulatory activity of malononitrilamides, derivatives of leflunomide's primary metabolite, on models of experimental rheumatoid arthritis. *Transplant Proc* 1998; 30 (8): 4137-9.

Schorlemmer HU, Bartlett RR. Malononitrilamides (MNA 279 and MNA 715) have therapeutic activity in acute and chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis (EAE). *Inflamm Res* 1997c; 46 Suppl 2: S163-4.

Schorlemmer HU, Bartlett RR. Prevention of the development of murine systemic lupus erythematosus (SLE)-like diseases by the malononitrilamides MNA 279 and MNA 715. *Inflamm Res* 1997d; 46 Suppl 2: S167-8.

Schorlemmer HU, Kurrle R, Bartlett RR. Malononitrilamides inhibit the development of various murine graft-vs-host diseases. *Transplant Proc* 1996; 28 (6): 3043-7.

Schorlemmer HU, Kurrle R, Bartlett RR. The new immunosuppressants, the malononitrilamides MNA 279 and MNA 715, inhibit various graft-vs.-host diseases (GvHD) in rodents. *Drugs Exp Clin Res* 1997a; 23 (5-6): 167-73.

Schorlemmer HU, Kurrle R, Schleyerbach R, Bartlett RR. Disease-modifying activity of malononitrilamides, derivatives of leflunomide's active metabolite, on models of rheumatoid arthritis. *Inflamm Res* 1999c; 48 Suppl 2: S113-4.

Schorlemmer HU, Kurrle R, Schleyerbach R, Bartlett RR. Generation of O₂⁻ radicals in macrophages can be inhibited in vitro and in vivo by derivatives of leflunomide's primary metabolite. *Inflamm Res* 1999a; 48 Suppl 2: S117-8.

Schorlemmer HU, Kurrle R. Synergistic activity of malononitrilamides with cyclosporine to control and reverse xenograft rejection. *Int J Tissue React* 1997b; 19 (3-4):149-56.

Schorlemmer HU, Kurrle R. Malononitrilamides reduce IgM and IgG xenoantibodies and prolong skin xenograft survival in a mouse-to rat model. *Transplant Proc* 1998; 30 (4): 976-9.

Schuurman HJ, Fringeli-Tanner M, Pally C, Papageorgiou C. Mycophenolate sodium: tolerability and efficacy in transplantation in the rat. *Transpl Immunol* 2002; 9 (2-4): 187-95.

Scornik JC. Detection of alloantibodies by flow cytometry: relevance to clinical transplantation. *Cytometry* 1995; 22 (4): 259-63.

Sedmak DD, Knight DA, Vook NC, Waldman JW. Divergent patterns of ELAM-1, ICAM-1, and VCAM-1 expression on cytomegalovirus-infected endothelial cells. *Transplantation* 1994; 58 (12): 1379-85.

Segel LD, vonHaag DW, Zhang J, Follette DM. Selective overexpression of inflammatory molecules in hearts from brain-dead rats. *Heart Lung Transplant* 2002; 21 (7): 804-11.

Sehgal SN, Baker H, Vezina C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)* 1975; 28 (10): 727-32.

Sehgal SN, Molnar-Kimber K, Ocain TO, Weichman BM. Rapamycin: a novel immunosuppressive macrolide. *Med Res Rev* 1994; 14: 1-22.

Sehgal SN. Rapamune (sirolimus, rapamycin): an overview and mechanism of action. *Ther Drug Monit* 1995; 17: 660-5.

Sehgal SN. Rapamune[®] (RAPA, rapamycin, sirolimus): Mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin Biochem* 1998; 31 (5): 335-40.

Shackleton CR, Ettinger SL, McLoughlin MG, Scudamore CH, Miller RR, Keown PA. Effect of recovery from ischemic injury on class I and class II MHC antigen expression. *Transplantation* 1990; 49 (3): 641-4.

Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343 (4): 230-8.

Shapiro AM, Suarez-Pinzon WL, Power R, Rabinovitch A. Combination therapy with low dose sirolimus and tacrolimus is synergistic in preventing spontaneous and recurrent autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* 2002; 45 (2): 224-30.

Shehata M, Cope GH, Johnson TS, Raftery AT, el Nahas AM. Cyclosporine enhances the expression of TGF-beta in the juxtaglomerular cells of the rat kidney. *Kidney Int* 1995; 48 (5): 1487-96.

Shi C, Lee WS, He Q, Zhang D, Fletcher DL Jr, Newell JB, Haber E. Immunologic basis of transplant-associated arteriosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93 (9): 4051-6.

Shihab FS, Andoh TF, Tanner AM, Noble NA, Border WA, Franceschini N, Bennett WM. Role of transforming growth factor-beta 1 in experimental chronic cyclosporine nephropathy. *Kidney Int* 1996; 49 (4): 1141-51.

Shipkova M, Armstrong VW, Weber L, Niedmann PD, Wieland E, Haley J, Tonshoff B, Oellerich M; German Study Group on Mycophenolate Mofetil Therapy in Pediatric Renal Transplant Recipients. Pharmacokinetics and protein adduct formation of the pharmacologically active acyl glucuronide metabolite of mycophenolic acid in pediatric renal transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2002; 24 (3): 390-9.

Shiraishi T, Yasunami Y, Takehara M, Uede T, Kawahara K, Shirakusa T. Prevention of acute lung allograft rejection in rat by CTLA4Ig. *Am J Transplant* 2002 Mar;2(3):223-8

Malm H, Corbascio M, Osterholm C, Cowan S, Larsen CP, Pearson TC, Ekberg H. CTLA4ig induces long-term graft survival of allogeneic skin grafts and totally inhibits T-cell proliferation in LFA-1-deficient mice. *Transplantation* 2002; 73 (2): 293-7.

Shumway SJ, Baughman KL, Traill TA, Cameron DE, Fonger JD, Gardner TJ, Achuff SC, Reitz BA, Baumgartner WA. Persistent pulmonary hypertension after heterotopic heart transplantation: a case report. *J Heart Transplant* 1989; 8: 387-90.

Siemasko KF, Chong ASF, Williams JW, Bremer EG, Finnegan A. Regulation of B cell function by the immunosuppressive agent leflunomide. *Transplantation* 1996; 61: 635-42.

Sievers TM, Rossi SJ, Ghobrial RM, Arriola E, Nishimura P, Kawano M, Holt CD. Mycophenolate mofetil. *Pharmacotherapy* 1997; 17 (6): 1178-97.

Sigalet DL, Thorne PC, Williams DC, Martin GR, Yatscoff RW. Effect of combined immunosuppressive drug therapy on small intestinal nutrient transport in the rat. *Clin Biochem* 1999; 32 (1): 51-7.

Silva Junior HT, Morris RE. Leflunomide and malononitrilamides. *Am J Med Sci* 1997; 313 (5): 289-301.

Simpson KM, Bunch DL, Amemiya H, Boehmig HJ, Wilson CB, Dixon FJ, Coburg AJ, Hathaway WE, Giles GR, Starzl TE. Humoral antibodies and coagulation mechanisms in the accelerated or hyperacute rejection of renal homografts in sensitized canine recipients. *Surgery* 1970; 68 (1): 77-85.

Smith CI, Notarangelo LD. Molecular basis for X-linked immunodeficiencies. *Adv Genet* 1997; 35: 57-115.

Sollinger HW, Belzer FO, Deierhoi MH, Diethelm AG, Gonwa TA, Kauffman RS, Klintmalm GB, McDiarmid SV, Roberts J, Rosenthal JT, et al. RS-61443 (mycophenolate mofetil). A multicenter study for refractory kidney transplant rejection. *Ann Surg* 1992; 216 (4): 513-9.

Sousa JE, Costa MA, Abizaid A, Abizaid AS, Feres F, Pinto IMF, Seixas AC, Staico R, Mattos LA, Sousa AGMR, Falotico R, Jaeger J, Popma JJ, Serruys PW. Lack of neointimal

proliferation after implantation of sirolimus-coated stents in human coronary arteries. A quantitative coronary angiography and three-dimensional intravascular ultrasound study. *Circulation* 2001; 103: 192-5.

Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76 (2): 301-14.

Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Saitta A, Deodato B, Arlotta M, Minutoli L, Quartarone C, Ferlito M, Caputi AP. Tacrolimus limits polymorphonuclear leucocyte accumulation and protects against myocardial ischaemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32 (3): 429-40.

Starzl TE, Halgrimson CG, Penn I. Cyclophosphamide and human organ transplantation. *Lancet* 1971; 2: 70-4.

Starzl TE, Machiuro TL, Hermann GG. Renal homografts in patients with major donor-recipient blood group incompatibilities. *Surg Forum* 1963; 14: 214.

Stastny P. Accelerated graft rejection in the offspring of immunized mothers. *J Immunol* 1965; 95 (5): 929-36.

Steeber D. A., Tang M. L. K., Green N. E., Zhang X-Q., Sloane J. E., Tedder T. F. Leukocyte entry into sites of inflammation requires overlapping interactions between the l-selectin and icam-1 pathways. *J Immunol* 1999; 163: 2176-86.

Steiniger B, Stehling O, Scriba A, Grau V. Monocytes in the rat: phenotype and function during acute allograft rejection. *Immunol Rev* 2001; 184: 38-44.

Stepkowski SM, Chen H, Daloze P, Kahan BD. Rapamycin, a potent immunosuppressive drug for vascularized heart, kidney, and small bowel transplantation in the rat. *Transplantation* 1991; 51 (1): 22-6.

Stepkowski SM, Chen HF, Wang ME, Daloze P, Kahan BD. Inhibition of host-versus-graft and graft-versus-host responses after small bowel transplantation in rats by rapamycin. *Transplantation* 1992; 53 (2): 258-64.

Stepkowski SM, Kahan BD. Synergistic activity of the triple combination: cyclosporine, rapamycin, and brequinar. *Transplant Proc* 1993; 25 (3) Suppl. 2: 29-31.

Stepkowski SM, Napoli KL, Wang ME, Qu X, Chou TC, Kahan BD. Effects of the pharmacokinetic interaction between orally administered sirolimus and cyclosporine on the synergistic prolongation of heart allograft survival in rats. *Transplantation* 1996; 62 (7): 986-94.

Stewart JH, Sheil AG, Johnson JR, Wyatt KM, Sharp AM, Johnston JM. Successful renal allotransplantation in presence of lymphocytotoxic antibodies. Importance of preoperative cross-matching. *Lancet* 1969; 1 (7587): 176-8.

Stock P, Sutherland DE, Fryd DS, Ascher NL, Payne WD, Simmons RL, Najarian JS. Detrimental effect of ABO mismatching in renal transplantation. *Transplant Proc* 1987; 19 (1 Pt 1): 711-2.

Streblow DN, Kreklywich C, Yin Q, De La Melena VT, Corless CL, Smith PA, Brakebill C, Cook JW, Vink C, Bruggeman CA, Nelson JA, Orloff SL. Cytomegalovirus-mediated upregulation of chemokine expression correlates with the acceleration of chronic rejection in rat heart transplants. *J Virol* 2003; 77 (3): 2182-94.

Strom TB, Tilney NL, Carpenter CB, Busch GJ. Identity and cytotoxic capacity of cells infiltrating renal allografts. *N Engl J Med* 1975; 292 (24): 1257-63.

Strom TB, Tilney NL, Paradysz JM, Bancewicz J, Carpenter CB. Cellular components of allograft rejection: identity, specificity, and cytotoxic function of cells infiltrating acutely rejecting allografts. *J Immunol* 1977; 118 (6): 2020-6.

Sturrock ND, Lang CC, Struthers AD. Cyclosporin-induced nephrotoxicity and hypertension. *Br J Hosp Med* 1992; 48 (8): 483-5, 488-9.

Sueda T, Matsuura Y, Matsushima T, Mukai S, Kajihara H. A heterotopic cardiac transplantation model for evaluation of rejection using transvenous endomyocardial biopsy. *Hiroshima J Med Sci* 1990; 39 (1): 15-8.

Sumitran-Holgersson S. HLA-specific alloantibodies and renal graft outcome. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16 (5): 897-904.

Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366: 151-65.

Suthanthiran M. Acute rejection of renal allografts: mechanistic insights and therapeutic options. *Kidney Int* 1997; 51 (4): 1289-304.

Suzuki J, Isobe M, Izawa A, Takahashi W, Yamazaki S, Okubo Y, Amano J, Sekiguchi M. Differential Th1 and Th2 cell regulation of murine cardiac allograft acceptance by blocking cell adhesion of ICAM-1/LFA-1 and VCAM-1/VLA-4. *Transpl Immunol* 1999; 7 (1): 65-72.

Suzuki M, Inauen W, Kvietys PR, Grisham MB, Meininger C, Schelling ME, Granger HJ,

Granger DN. Superoxide mediates reperfusion-induced leukocyte-endothelial cell interactions. *Am J Physiol* 1989; 257 (5 Pt 2): H1740-5.

Suzuki S, Kimura T, Ando K, Sawada M, Tamura G. Antitumor activity of mycophenolic acid. *J Antibiot* 1969; 22: 297-302.

Swanson SJ, Hale DA, Mannon RB, Kleiner DE, Cendales LC, Chamberlain CE, Polly SM, Harlan DM, Kirk AD. Kidney transplantation with rabbit antithymocyte globulin induction and sirolimus monotherapy. *Lancet* 2002; 360 (9346): 1662-4.

Szeto WY, Krasinskas AM, Kreisel D, Krupnick AS, Popma SH, Rosengard BR. Depletion of recipient CD4+ but not CD8+ T lymphocytes prevents the development of cardiac allograft vasculopathy. *Transplantation* 2002; 73 (7): 1116-22.

Takada M, Nadeau KC, Shaw GD, Marquette KA, Tilney NL. The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by a soluble P-selectin ligand. *J Clin Invest* 1997; 99 (11): 2682-90.

Takazawa K, Hosoda Y, Bashuda H, Seino K, Yagita H, Tamatani T, Miyasaka M, Okumura K. Synergistic effects of mycophenolate mofetil (MMF, RS-61443) and anti-LFA-1/ICAM-1 monoclonal antibodies on the prolongation of heart allograft survival in rats. *Transplant Proc* 1996; 28 (3): 1980-1.

Tanabe M, Todo S, Murase N, Irish W, Miyazawa H, Fujisaki S, Starzl TE. Combined immunosuppressive therapy with low dose FK506 and antimetabolites in rat allogeneic heart transplantation. *Transplantation* 1994; 58 (1): 23-7.

Tang W, Stearns RA. Heterotropic cooperativity of cytochrome P450 3A4 and potential drug-drug interactions. *Curr Drug Metab* 2001; 2 (2): 185-98.

Taylor A, Knox KW, Work E. Chemical and biological properties of an extracellular lipopolysaccharide from *Escherichia coli* grown under lysine-limiting conditions. *Biochem J* 1966; 99 (1): 53-61.

Taylor DO. The use of tacrolimus and mycophenolate mofetil after cardiac transplantation. *Cur Opin Cardiol* 1997; 12: 161-5.

Terada N, Lucas JJ, Szepesi A, Franklin RA, Domenico J, Gelfand EW. Rapamycin blocks cell cycle progression of activated T cells prior to events characteristic of the middle to late G1 phase of the cycle. *J Cell Physiol* 1993; 154 (1): 7-15.

The Mycophenolate Mofetil Renal Refractory Rejection Study Group. Rescue therapy with mycophenolate mofetil. *Clin Transplant* 1996; 10 (1 Pt 2): 131-5.

The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group. A blinded, randomized clinical trial of mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in cadaveric renal transplantation. *Transplantation* 1996; 61 (7): 1029-37.

Thiru S, Waldmann H. *Pathology and Immunology of Transplantation and Rejection*. 1st Edition, Blackwell Publishers, 2000.

Thomson AW, Bonham CA, Zeevi A. Mode of action of tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanisms. *Ther Drug Monit* 1995; 17: 584-91.

Thornhill MH, Wellicome SM, Mahiouz DL, Lanchbury JS, Kyan-Aung U, Haskard DO. Tumor necrosis factor combines with IL-4 or IFN-gamma to selectively enhance endothelial cell adhesiveness for T cells. The contribution of vascular cell adhesion

molecule-1-dependent and -independent binding mechanisms. *J Immunol* 1991; 146 (2): 592-8.

Tice DG, Bruch D, Ikramuddin S. Anti-VLA-4 and cyclosporine synergistically prolong rat heterotopic small bowel allograft. *Transplant Proc* 1996; 28 (5): 2496.

Tilney NL, Milford EL, Araujo JL, Strom TB, Carpenter CB, Kirkman RL. Experience with cyclosporine and steroids in clinical renal transplantation. *Ann Surg* 1984; 200 (5): 605-13.

Todo S, Demetris A, Ueda Y, Imventarza O, Cadoff E, Zeevi A, Starzl TE. Renal transplantation in baboons under FK 506. *Surgery* 1989; 106 (2): 444-50; discussion 450-1.

Todo S, Demetris AJ, Ueda Y, Imventarza O, Okuda K, Casavilla A, Cemaj S, Ghalab A, Mazzaferro V, Rhoe BS, et al. Canine kidney transplantation with FK-506 alone or in combination with cyclosporine and steroids. *Transplant Proc* 1987; 19 (5 Suppl 6): 57-61.

Townsend MJ, Fallo PG, Matthews DJ. IL-9 deficient mice establish fundamental roles for IL-9 in pulmonary mastocytosis and goblet cell hyperplasia but not T cell development. *Immunity* 2000; 13: 573-83.

Tran TT, Dai W, Sarkar HK. Cyclosporin A inhibits creatine uptake by altering surface expression of the creatine transporter. *J Biol Chem* 2000; 275 (46): 35708-14.

Trompeter R, Filler G, Webb NJ, Watson AR, Milford DV, Tyden G, Grenda R, Janda J, Hughes D, Ehrich JH, Klare B, Zacchello G, Bjorn Brekke I, McGraw M, Perner F, Ghio L, Balzar E, Friman S, Gusmano R, Stolpe J. Randomized trial of tacrolimus versus cyclosporin microemulsion in renal transplantation. *Pediatr Nephrol* 2002; 17 (3): 141-9.

Tu Y, Stepkowski SM, Chou TC, Kahan B. The synergistic effects of cyclosporine, sirolimus, and brequinar on heart allograft survival in mice. *Transplantation* 1995; 59 (2): 177-83.

Tyagi S, Klickstein LB, Nicholson-Weller A. C5a-stimulated human neutrophils use a subset of beta2 integrins to support the adhesion-dependent phase of superoxide production. *J Leukoc Biol* 2000; 68 (5): 679-86.

Uckun FM, Zheng Y, Cetkovic-Cvrlje M, Vassilev A, Lisowski E, Waurzyniak B, Chen H, Carpenter R, Chen CL. In vivo pharmacokinetic features, toxicity profile, and chemosensitizing activity of alpha-cyano-beta-hydroxy-beta-methyl-N-(2,5-dibromophenyl) propenamide (LFM-A13), a novel antileukemic agent targeting Bruton's tyrosine kinase. *Clin Cancer Res* 2002; 8 (5): 1224-33.

United Network for Organ Sharing, 2003: www.unos.org

US Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. Mycophenolate mofetil in cadaveric renal transplantation. *Am J Kidney Dis* 1999 Aug;34(2): 296-303.

Valentin JF, Bruijn JA, Paul LC. Donor treatment with mycophenolate mofetil: protection against ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transplantation* 2000; 69 (3): 344-50.

Valujskikh A, Matesic D, Heeger PS. Characterization and manipulation of T cell immunity to skin grafts expressing a transgenic minor antigen. *Transplantation* 1999; 68 (7): 1029-36.

van der Kwast TH, Benner R. T1 and T2 lymphocytes in primary and secondary

delayed type hypersensitivity of mice. I. Contribution in the response to sheep red blood cells and to allogeneic spleen cells. *Cell Immunol* 1978; 39 (1): 194-203.

van Gelder T, ter Meulen CG, Hene R, Weimar W, Hoitsma A. Oral ulcers in kidney transplant recipients treated with sirolimus and mycophenolate mofetil. *Transplantation* 2003; 75 (6): 788-91.

van Schilfgaarde R, Hermans P, Terpstra JL, van Breda Vriesman PJ. Role of mobile passenger lymphocytes in the rejection of renal and cardiac allografts in the rat. A passenger lymphocyte-mediated graft-versus-host reaction amplifies the host response. *Transplantation* 1980; 29 (3): 209-13.

Van Scott EJ. Therapy of psoriasis 1975. *JAMA* 1976; 235 (2): 197-8.

Vathsala A, Chou TC, Kahan BD. Analysis of the interactions of immunosuppressive drugs with cyclosporine in inhibiting DNA proliferation. *Transplantation* 1990; 49 (2): 463-72.

Venuta F, Rendina EA, Ciriaco P, De Giacomo T, Pompeo E, Bachetoni A, Ricci C. Efficacy of cyclosporine to reduce steroids in patients with idiopathic pulmonary fibrosis before lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1993; 12 (6 Pt 1): 909-14.

Vermehren D, Sumitran-Holgersson S. Isolation of precursor endothelial cells from peripheral blood for donor-specific crossmatching before organ transplantation. *Transplantation* 2002; 74 (11): 1479-86.

Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)* 1975; 28 (10): 721-6.

Vial C, Crozatier B, Goldschmidt D, Font B. Adenine nucleotide content and regional function during ischemia and reperfusion in canine ventricular myocardium. *Basic Res Cardiol* 1982; 77 (6): 645-55.

Viale M, Bacigalupo A, Ferrini S, Nicolini A. Effect of cyclosporin A on T cell clones from severe aplastic anemia: differential sensitivity of TNF and GM-CSF production. *Haematologica* 1992; 77 (3): 237-42.

Viklicky O, Kvasnicka J, Teplan V, Vitko S. Atherogenesis markers in patients with chronic rejection of renal allografts. *Ann Transplant* 2001; 6 (2): 16-8.

Viklicky O, Zou H, Muller V, Lacha J, Szabo A, Heemann U. SDZ-RAD prevents manifestation of chronic rejection in rat renal allografts. *Transplantation* 2000; 69 (4): 497-502.

Vincenti F, Jensik SC, Filo RS, Miller J, Pirsch J. A long-term comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine in kidney transplantation: evidence for improved allograft survival at five years. *Transplantation* 2002; 73 (5): 775-82.

Vincenti F, Ramos E, Brattstrom C, Cho S, Ekberg H, Grinyo J, Johnson R, Kuypers D, Stuart F, Khanna A, Navarro M, Nashan B. Multicenter trial exploring calcineurin inhibitors avoidance in renal transplantation. *Transplantation* 2001; 71 (9): 1282-7.

Vincenti F. Action, efficacy and toxicities: anti-CD25 monoclonal antibodies. Dans Norman DJ, Turka LA, Eds. *Primer on Transplantation*, Second Edition, American Society of Transplantation, 2001.

Vogelin E, Jones NF, Rao UN. Long-term viability of articular cartilage after microsurgical whole-joint transplantation and immunosuppression with rapamycin, mycophenolate mofetil, and tacrolimus. *J Hand Surg [Am]* 2002; 27 (2): 307-15.

Voiglio E, Desseigne P, Tourniaire F, Margonari J, De Lorgeril M, Tabib A. Echocardiography is not a good way of monitoring cardiac grafts after abdominal heterotopic transplantation in the rat. *Transplant Proc* 1995; 27 (2): 1690.

von Willebrand E., Jurcic V., Isoniemi H., Häyry P., Paavonen T., Krogerus L. Adhesion molecules and their ligands in chronic rejection of human renal allografts. *Transplant Proc* 1997; 29: 1530-1.

von Freeden-Jeffry U, Vieira P, Lucian LA, McNeil T, Burdach SE, Murray R. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* 1995; 181 (4): 1519-26.

Vu MD, Qi S, Xu D, Wu J, Fitzsimmons WE, Sehgal SN, Dumont L, Busque S, Daloze P, Chen H. Tacrolimus and sirolimus (rapamycin) in combination are not antagonistic but produce extended graft survival in cardiac transplantation in the rat. *Transplantation* 1997; 64 (12): 1853-6.

Wahl SM, Hunt DA, Bansal G, McCartney-Francis N, Ellingsworth L, Allen JB.v. Bacterial cell wall-induced immunosuppression. Role of transforming growth factor beta. *J Exp Med* 1988; 168 (4): 1403-17.

Wahrmann M, Exner M, Regele H, Derfler K, Kormoczi GF, Lhotta K, Zlabinger GJ, Bohmig GA. Flow cytometry based detection of HLA alloantibody mediated classical complement activation. *J Immunol Methods* 2003; 275 (1-2): 149-60.

Wakai A. Effect of adenosine on ischaemia-reperfusion injury associated with rat pancreas transplantation. *Br J Surg* 2002; 89 (4): 494.

Waldman WJ, Knight DA, Adams PW, Orosz CG, Sedmak DD. In vitro induction of endothelial adhesion molecule and MHC antigen expression by cytomegalovirus-activated CD4+ T cells. *Transplant Proc* 1995; 27 (1): 1269-71.

Waldmeier PC, Feldtrauer JJ, Qian T, Lemasters JJ. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by the nonimmunosuppressive cyclosporin derivative NIM811. *Mol Pharmacol* 2002; 62 (1): 22-9.

Waller JR, Murphy GJ, Bicknell GR, Toomey D, Nicholson ML. Effects of the combination of rapamycin with tacrolimus or cyclosporin on experimental intimal hyperplasia. *Br J Surg* 2002; 89 (11): 1390-5.

Wang C, Kerrigan CL, Stotland M. Kinetics of E-selectin expression in surgical flaps. *Plast Reconstr Surg* 1997; 100 (6): 1482-8.

Wang J, Morris RE. Effect of splenectomy and mono- or combination therapy with rapamycin, the morpholinoethyl ester of mycophenolic acid and deoxyspergualin on cardiac xenograft survival. *Transplant Proc* 1991; 23 (1 Pt 1): 699-702.

Wang K, Zhou Z, Tarakji K, Qin JX, Sitges M, Shiota T, Forudi F, Schaub RG, Kumar A, Penn MS, Topol EJ, Lincoff AM. Recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand-Ig (rPSGL-Ig) attenuates infarct size and myeloperoxidase activity in a canine model of ischemia-reperfusion. *Thromb Haemost* 2002; 88 (1): 149-54.

Wang W, Schulze CJ, Suarez-Pinzon WL, Dyck JR, Sawicki G, Schulz R. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation* 2002; 106 (12): 1543-9.

Wang X, Chen H, Yin H, Kim SS, Lin Tan S, Gosden RG. Fertility after intact ovary transplantation. *Nature* 2002; 415 (6870): 385.

Warbrick EV, Thomas AL, Williams CM. The effects of cyclosporin A, dexamethasone and other immunomodulatory drugs on induced expression of IL-3, IL-4 and IL-8 mRNA in a human mast cell line. *Toxicology* 1997; 116 (1-3): 211-8.

Ward SG, Reif K, Ley S, Fry MJ, Waterfield MD, Cantrell DA. Regulation of phosphoinositide kinases in T cells. Evidence that phosphatidylinositol 3-kinase is not a substrate for T cell antigen receptor-regulated tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1992; 267 (33): 23862-9.

Wasowska B, Hancock WW, Onodera K, Korom S, Stadlbauer HW, Zheng XX, Strom TB, Kupiec-Weglinski JW. Rapamycin and cyclosporine A treatment : a novel regimen to prevent chronic allograft rejection in sensitized hosts. *Transplant Proc* 1997; 29 (1-2): 333.

Weber C, Springer TA. Interaction of very late antigen-4 with VCAM-1 supports transendothelial chemotaxis of monocytes by facilitating lateral migration. *J Immunol* 1998; 161 (12): 6825-34.

Weigel G, Griesmacher A, Karimi A, Zuckermann AO, Grimm M, Mueller MM. Effect of mycophenolate mofetil therapy on lymphocyte activation in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21 (10): 1074-9.

Weigel G, Griesmacher A, Zuckermann AO, Laufer G, Mueller MM. Effect of mycophenolate mofetil therapy on inosine monophosphate dehydrogenase induction in red blood cells of heart transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69 (3): 137-44.

Wennberg L, Karlsson-Parra A, Sundberg B, Rafael E, Liu J, Zhu S, Groth CG, Korsgren O. Efficacy of immunosuppressive drugs in islet xenotransplantation. *Transplantation* 1997; 63 (9): 1234-42.

Whiting PH, Woo J, Adam BJ, Hasan NU, Davidson RJ, Thomson AW. Toxicity of rapamycin--a comparative and combination study with cyclosporine at immunotherapeutic dosage in the rat. *Transplantation* 1991; 52 (2): 203-8.

Widder J, Dorfinger K, Wilfing A, Trieb K, Pirich K, Loebenstein R, Niederle B, Gessl A, Spitzauer S, Grubeck-Loebenstein B. The immunoregulatory influence of transforming growth factor beta in thyroid autoimmunity: TGF beta inhibits autoreactivity in Graves' disease. *J Autoimmun* 1991; 4 (4): 689-701.

Wieder KJ, Hancock WW, Schmidbauer G, Corpier CL, Wieder I, Kobzik L, Strom TB, Kupiec-Weglinski JW. Rapamycin treatment depresses intragraft expression of KC/MIP-2, granzyme B, and IFN-gamma in rat recipients of cardiac allografts. *J Immunol* 1993; 151 (2): 1158-66.

Wiesel M, Carl S. European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. A placebo controlled study of mycophenolate mofetil used in combination with cyclosporine and corticosteroids for the prevention of acute rejection in renal allograft recipients: 1-year results. *J Urology* 1998; 159: 28-33.

Wilhelm MJ, Pratschke J, Beato F, Taal M, Kusaka M, Hancock WW, Tilney NL. Activation of the heart by donor brain death accelerates acute rejection after transplantation. *Circulation* 2000; 102 (19): 2426-33.

Williams GM, Hume DM, Hudson RP Jr, Morris PJ, Kano K, Milgrom F. "Hyperacute" renal-homograft rejection in man. *N Engl J Med* 1968; 279 (12): 611-8.

Williams JW, Mital D, Chong A, Kottayil A, Millis M, Longstreth J, Huang W, Brady L, Jensik S. Experiences with leflunomide in solid organ transplantation. *Transplantation* 2002; 73 (3): 358-66.

Williams RH, Boeck LD, Cline JC, DeLong DC, Gerzon K, Gordee RS, Gorman M, Holmes RE, Larsen SH, Lively DH, Matthews TR, Nelson JD, Poore GA, Stark WM, Sweeney MJ. Fermentation, isolation, and biological properties of mycophenolic acid. *Antimicrobial Agents Chemother* 1968a; 8: 229-33.

Williams RH, Lively DH, DeLong DC, Cline JC, Sweeney MJ. Mycophenolic acid: antiviral and antitumor properties. *J Antibiot (Tokyo)* 1968b; 21 (7): 463-4.

Williamson RA, Yea CM, Robinson PA, Curnock A, Gadher S, Hambleton AB, Woodward K, Bruneau JM, Hambleton P, Moss D, Thomson TA, Spinella-Jaegle S, Morand P, Courtin O, Sautes C, Westwood R, Hercend T, Kuo EA, Ruuth E. Dihydroorotate dehydrogenase, a high affinity protein binding to A771726 and mediator of a range of biological effects of the immunomodulatory compound. *J Biol Chem* 1995; 270 (38): 22467-72.

Won YH, Sauder DN, McKenzie RC. Cyclosporin A inhibits keratinocyte cytokine gene expression. *Br J Dermatol* 1994; 130 (3): 312-9.

Wood MA, Bierer BE. Rapamycin: biological and therapeutic effects, binding by immunophilins and molecular targets of action. *Persp In Drug Disc Des* 1994; 2: 163.

Wu GD, Jin YS, Salazar R, Dai WD, Barteneva N, Barr ML, Barsky, Starnes VA Cramer DV. Vascular endothelial cell apoptosis induced by anti-donor non-MHC antibodies: a possible injury pathway contributing to chronic allograft rejection. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21 (11): 1174-87.

Wurster AL, Rodgers VL, Satoskar AR, Whitters MJ, Young DA, Collins M, Grusby MJ. Interleukin 21 is a T helper (Th) cell 2 cytokine that specifically inhibits the differentiation of naive Th cells into interferon gamma-producing Th1 cells. *J Exp Med* 2002; 196 (7): 969-77.

Xu S, Shao YL, Eichwald EJ. Rejection criteria for the heterotopically placed mouse heart. *Transplantation* 1992; 53 (3): 712.

Xu X, Williams JW, Bremer EG, Finnegan A, Chong AS. Inhibition of protein tyrosine phosphorylation in T cells by a novel immunosuppressive agent, leflunomide. *J Biol Chem* 1995; 270 (21): 12398-403.

Yamada J, Kurimoto I, Streilein JW. Role of CD4+ T cells in immunobiology of orthotopic corneal transplants in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40 (11): 2614-21.

Yamani MH, Starling RC, Goormastic M, Van Lente F, Smedira N, McCarthy P, Young JB. The impact of routine mycophenolate mofetil drug monitoring on the treatment of cardiac allograft rejection. *Transplantation* 2000; 69 (11): 2326-30.

Yang CW, Ahn HJ, Han HJ, Kim WY, Li C, Shin MJ, Kim SK, Park JH, Kim YS, Moon IS, Bang BK. Pharmacological preconditioning with low-dose cyclosporine or FK506

reduces subsequent ischemia/reperfusion injury in rat kidney. *Transplantation* 2001; 72 (11): 1753-9.

Yang H, Issekutz TB, Wright JR Jr. Prolongation of rat islet allograft survival by treatment with monoclonal antibodies against VLA-4 and LFA-1. *Transplantation* 1995; 60 (1) : 71-6.

Yang H, Issekutz TB, Wright JR. Prolongation of rat islet allograft survival by treatment with monoclonal antibodies against VLA-4 and LFA-1. *Transplantation* 1995; 60 (1): 71-6.

Yin DP, Ma LL, Sankary HN, Shen J, Zeng H, Varghese A, Chong AS. Role of CD4+ and CD8+ T cells in the rejection of concordant pancreas xenografts. *Transplantation* 2002; 74 (9): 1236-41.

Younes M, Schoenberg MH, Jung H, Fredholm BB, Haglund U, Schildberg FW. Oxidative tissue damage following regional intestinal ischemia and reperfusion in the cat. *Res Exp Med (Berl)* 1984; 184 (4): 259-64.

Yuh DD, Gandy KL, Morris RE, Hoyt G, Gutierrez J, Reitz BA, Robbins RC. Leflunomide prolongs pulmonary allograft and xenograft survival. *J Heart Lung Transplant* 1995; 14 (6 Pt 1): 1136-44.

Zanker B, Schleibner S, Schneeberger H, Krauss M, Land W. Mycophenolate mofetil in patients with acute renal failure: evidence of metabolite (MPAG) accumulation and removal by dialysis. *Transpl Int* 1996;9 Suppl 1:S308-10.

Zimmerman GA. Two by two: The pairing of P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand 1. *PNAS* 2001; 98 (18): 10023-4.

Zinkernagel RM, Callahan GN, Althage A, Cooper S, Klein PA, Klein J. On the thymus in the differentiation of "H-2 self-recognition" by T cells: evidence for dual recognition? *J Exp Med* 1978; 147 (3): 882-96.

Zocher R, Nihira T, Paul E, Madry N, Peeters H, Kleinkauf H, Keller U. Biosynthesis of cyclosporin A: partial purification and properties of a multifunctional enzyme from *Tolypocladium inflatum*. *Biochemistry* 1986; 25 (3): 550-3.

Zohlhöfer D, Brand K, Schipek K, Pogatsa-Murray G, Schomig A, Neumann FJ. Adhesion of monocyte very late antigen-4 to endothelial vascular cell adhesion molecule-1 induces interleukin-1beta-dependent expression of interleukin-6 in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20 (2): 353-9.

CHAPITRE IX

ANNEXES

ANNEXE 1 : **LES GRANDES ÉPOQUES DE L'ÉVOLUTION CHIRURGICALE***

**Résumé de Kahan, 1991; Brent, 1997; Groth et al., 2000; Duquesnoy, 2002a.*

Les premières transplantations à être rapportées remontent au deuxième siècle avant J.-C.. À cette époque, la pratique d'autogreffes cutanées en rhinoplastie se fit couramment jusqu'au seizième siècle. Le chirurgien italien Gaspare Tagliacozzi fut un des rares scientifiques de l'époque à reconnaître le principe de l'individualité des transplantations de type autogreffe, et à réfuter la possibilité de réussite quant aux greffes entre individus ou espèces différents (Kahan, 1991). L'idée d'une transplantation d'organe entre individus (transplantation allogénique) voire même entre espèces différentes (xénotransplantation) ne fut explorée que vers le dix-huitième siècle quand le chirurgien anatomiste d'origine écossaise John Hunter, surnommé père de la chirurgie expérimentale, transplanta une molaire humaine chez un coq. Non seulement la transplantation allogreffe fut envisageable, mais la xénotransplantation devint une réalité. Le domaine de la chirurgie prit un tournant en 1905, lorsque Alexis Carrel en collaboration avec Charley Claude Guthrie développèrent la technique d'anastomose vasculaire (Brent, 1997). Cette technique chirurgicale révolutionnaire valut à Carrel le Prix Nobel de physiologie et de médecine, en 1912. Dorénavant, la transplantation d'organes vascularisés fut possible. Suite à cette découverte innovatrice, une nouvelle ère essentiellement consacrée à la transplantation vit le jour. Depuis le début du vingtième siècle jusqu'à aujourd'hui, les techniques et performances en transplantation n'ont cessé de s'améliorer (Tableau 1.1.2). La première greffe cornéenne fut effectuée par l'ophtalmologiste australien Edward Zim, en 1906. En 1908, le chirurgien suisse Jacques Louis Reverdin réalisa la première allogreffe de peau. La première transfusion sanguine fut réussie en 1918. En 1954, la première transplantation rénale réussie avec une isogreffe de donneur vivant (entre jumeaux identiques) fut exécutée par Joseph Murray et David Hume. Quelques années plus tard, en 1962, les deux cliniciens

réussirent la toute première transplantation rénale avec donneur cadavérique. Ces importantes contributions valurent à Joseph Murray le Prix Nobel de médecine, en 1990. Des greffes humaines utilisant des organes vascularisés cadavériques devinrent dorénavant réalisables. En 1963, Thomas Starzl, de l'Université du Colorado, effectua la première transplantation hépatique, tandis que James Hardy de l'Université du Mississippi réussit la première transplantation pulmonaire. La première transplantation cardiaque fut effectuée par Christiaan Barnard, en 1967, en Afrique du Nord. De la même année, à l'Université du Minnesota, Richard Lillehei accomplit la première transplantation du pancréas. Douze ans plus tard, en 1979, la première transplantation pancréatique avec donneur vivant fut réalisée. En 1981, Norman Shumway réussit la première transplantation cardiaque-pulmonaire, à l'Université de Stanford. Plus tard, en 1984, Thomas Starzl exécuta la première transplantation cardiaque-hépatique à Pittsburgh. Cette même année-là, la petite Baby Fae reçut un cœur de babouin, une primeur mondiale, au centre médical de l'Université de Loma Linda. En 1989, la première transplantation hépatique avec donneur vivant fut effectuée. Deux ans plus tard, en 1991, la première transplantation de l'intestin grêle fut réussie. Plus récemment, en 1996, la première transplantation hépatique de type « split-liver » fut réussie. En outre, les chirurgiens et cliniciens québécois ont contribué de manière importante à l'histoire de la transplantation au Canada. La première transplantation rénale avec donneur vivant s'est effectuée à Montréal, en 1958, et en 1963, avec donneur cadavérique. En 1968, la première transplantation cardiaque est exécutée à l'Institut de Cardiologie de Montréal. Deux ans plus tard, à l'hôpital Notre-Dame de Montréal, le docteur Pierre Daloze, un chirurgien d'origine belge, opérait la première transplantation hépatique avec succès (Groth et al., 2000; Duquesnoy, 2002a) .

ANNEXE 2:
IMMUNOBIOLOGIE DE LA TRANSPLANTATION:
LES ÉTAPES MARQUANTES*

**Résumé de Duquesnoy (2002a; 2002).*

Après la grande époque expérimentale du dix-huitième siècle, les chirurgiens et scientifiques comprirent rapidement que la technique chirurgicale ne fut pas le seul critère de réussite à la transplantation d'organes. Depuis plus de 250 ans, l'immunobiologie de la transplantation devint une discipline scientifique qui étudie les mécanismes par lesquels un receveur rejette ou accepte un greffon d'un donneur génétiquement différent. Des scientifiques de diverses disciplines se questionnèrent sur le problème du rejet d'organe: chirurgiens, oncologistes, généticiens, biologistes et immunologistes. Cependant, la majorité des concepts d'immunité en transplantation furent définis durant les deux premières décennies du vingtième siècle, notamment avec la grande contribution de Sir Peter Medawar. La première notion d'immunologie de la transplantation fut survolée par Gaspare Tagliacozzi, en 1596, qui reconnut le principe de la différence de l'individualité, et suggéra celle-ci comme étant responsable des échecs en transplantation allogénique. À cette époque, aucune notion de génétique ne fut encore connue, et ce jusqu'à l'arrivée de Mendel quelques 250 années plus tard. Dès le début du dix-neuvième siècle, plusieurs greffes de peau furent exécutées avec ou sans succès. Par contre, sans qu'on ne comprenne pourquoi, les greffes de cornée furent effectuées avec un grand taux de réussite. La notion de privilège immunologique ne fut pas encore comprise à cette époque. À la fin du dix-neuvième siècle, avec l'invention de la technique d'anastomose vasculaire d'Alexis Carrel, les tentatives de transplantation allogénique et xénogénique se multiplièrent. Entre autre, en 1933, le chirurgien ukrainien Voronoy effectua pour la première fois la transplantation rénale cadavérique, mais sans succès. À cette époque, il y eut une explosion de découvertes dans le domaine de l'immunologie dont Pasteur et la vaccination, Ehrlich et la notion

d'anticorps/d'antigène, voire Landsteiner et les groupes sanguins ABO. Cependant, ces concepts immunologiques firent plutôt référence à l'immunité humorale, l'immunité cellulaire et la fonction lymphocytaire étant encore inconnus. Au début du vingtième siècle, quelques scientifiques se questionnèrent sur la base immunologique des greffes de peau. En 1914, Underwood suggéra l'hypersensibilité anaphylactique comme étant responsable du rejet d'allogreffe. Vers les années 1917-1919, Davis et Shawan suggérèrent que les groupes sanguins jouent un rôle important dans l'acceptation ou le rejet de l'allogreffe. En 1924, Holman rapporta qu'une greffe de peau provenant d'un même donneur chez un receveur ayant préalablement reçu une allogreffe fut rejetée instantanément, voire de façon accélérée. Cependant, ce sont les oncologistes qui apportèrent le plus d'informations sur les mécanismes immunologiques à la base du rejet d'allogreffe. Durant les années 1912-1929, Schöne, Tyzzer et Wolglom publièrent chacun des ouvrages littéraires scientifiques distincts, en se référant à plus de 1100 publications. Ils formulèrent les règles suivantes: 1) les transplantations xénogéniques sont inévitablement rejetées; 2) les transplantations allogéniques sont habituellement rejetées; 3) les transplantations syngéniques sont presque toujours acceptées; 4) l'allogreffe est initialement acceptée puis rejetée par la suite; 5) les secondes allogreffes sont rejetées de façon accélérée si le receveur a déjà rejeté une greffe venant du même donneur, ou si le receveur a déjà été immunisé avec des anticorps du donneur; 6) il y a plus de chance de succès lorsque le donneur et le receveur sont compatibles au niveau de leurs groupes sanguins; 7) la présensibilisation pour un second rejet requiert la présence de cellules vivantes; 8) les anticorps cytotoxiques ne peuvent être détectés; 9) la réaction retardée est difficile à expliquer à part qu'un complexe immun se forme; 10) les lymphocytes sont prédominants au site du rejet; 11) il n'y a pas de spécificité tissulaire, mais plutôt une spécificité génétique aux antigènes; 12) tous les tissus vivants peuvent immuniser et induire le rejet accéléré; 13) l'immunité de la transplantation est systématique sauf dans certains organes comme le cerveau. En 1930, dans son livre intitulé « *Transplantation and Individuality* », le renommé biologiste Leo Loeb reconnaît les bases génétiques des différences individuelles et la notion d'incompatibilité en

transplantation. En 1935, George D. Snell fit la découverte du locus d'histocompatibilité (locus H) qui contrôle le rejet d'organe chez la souris. Durant la fin des années 30, à l'aide d'une série d'expériences sérologiques, Peter A. Gorer découvrit que de l'antigène II est exprimé chez certaines lignées de souris. En 1946, la contribution de Gorer et Snell amena le concept du gène majeur d'histocompatibilité, H-2, et l'identification de neuf allèles chez la souris. Ces chercheurs développèrent par la suite une série de souris qui diffèrent seulement au niveau du gène H-2. Ces souris de lignées congéniques sont encore largement utilisées et essentiellement utiles en recherche en immunologie. À part cette découverte importante, les années 1930 furent une période creuse pour la recherche en transplantation. Les chirurgiens conclurent que le taux de rejet d'allogreffe est beaucoup trop important (à part pour les greffes cornéennes) et que l'immunosuppression utilisant la radiation est peu pratique et non-spécifique. La recherche en transplantation perdit alors de son engouement. Vint ensuite, la Seconde Guerre Mondiale (Duquesnoy, 2002a).

Suite aux bombardements incessants de la guerre, il y eut une augmentation significative de grands brûlés pour qui l'autogreffe était impossible. La recherche sur la transplantation se devait de reprendre de plus bel afin de trouver une solution pour traiter ces patients. À l'aide d'une série d'expériences approfondies, Sir Peter Medawar conclut que le mécanisme du rejet d'allogreffe de peau appartenait à la catégorie des réactions immunes acquises. Il publia deux rapports importants durant la période de 1944 à 1945. Medawar reconnut l'importante contribution des leucocytes du donneur dans l'induction du rejet accéléré des greffes de peau. En 1949, Bennett et Fenner rapportèrent qu'il existe une analogie entre la réaction d'hypersensibilité retardée et l'immunité de transplantation en faisant allusion à leur réponse immune similaire à la réaction tuberculine. Cinq ans plus tard, Mitchison démontra que le transfert passif de cellules lymphoïdes, venant de donneurs déjà sensibilisés, induit l'immunité aux allogreffes transplantées. Peu de temps après, Medawar, Billingham et Sprent confirmèrent que l'immunité de transplantation a plutôt une base cellulaire qu'un

caractère humoral. Une décennie plus tard, le rôle fonctionnel des lymphocytes demeura toujours un mystère. Gowans fut le premier à tenter de comprendre le fonctionnement lymphocytaire, et ceci déclencha une série d'études s'échelonnant sur plus de 25 ans. Ainsi que la découverte d'importantes notions telles les cellules compétentes (Gowans), les réactions du greffon contre l'hôte (Medawar, Terasaki, Simonsen, Billingham et Brent) et la cytotoxicité lymphocytaire (Govaerts, Rosenau et Moon). Par la suite, Brunner et Cerrottini développèrent le test de cytotoxicité qui est encore fréquemment utilisé pour étudier les lymphocytes cytotoxiques. Ensuite, d'autres tests immunologiques furent développés tels la culture mixte lymphocytaire et la réaction mixte leucocytaire dans le but d'étudier les lymphocytes. Durant les années 60, Claman démontra que la formation d'anticorps requiert l'interaction entre les lymphocytes T et B. Cantor et Boyse identifièrent trois locus génétiques Ly-1, Ly-2 et Ly-3 pouvant servir à différencier les lymphocytes T cytotoxiques (CD8⁺) et les lymphocytes T auxiliaires (CD4⁺). Quelques années plus tard, les travaux de Steinmuller, Elkins et Guttman mis en commun démontrèrent que les réactions locales de type greffon contre l'hôte peuvent être induites par des splénocytes syngéniques introduites dans l'allogreffe des rats hybrides de génération F₁, et les auteurs introduisirent la notion de leucocyte de passage. Durant les années 50 et 60, l'immunologie de la transplantation commença à devenir une discipline scientifique distincte. En 1967, le « *Transplantation Society* » vit le jour et ses membres, des scientifiques, des chirurgiens et des cliniciens de différentes disciplines, n'eurent qu'une seule vocation commune, faire de la transplantation une intervention thérapeutique clinique pour traiter les patients défaillants en phase terminale (Duquesnoy, 2002b).

ANNEXE 3:

CYTOKINES ET CHIMIOKINES IMPLIQUÉES DANS L'INFLAMMATION ET LE REJET AIGU*

*Résumé de Abbas et al., 2000; Krensky, 2001; Samson et al., 1999.

Rôle des cytokines. Suite à la reconnaissance allogénique, les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ sont activés et sécrètent plusieurs cytokines. Les cytokines sont des protéines solubles produites par différents types cellulaires et elles sont les principaux médiateurs de communication entre les cellules du système immunitaire (par exemple, elles sont les médiateurs de l'inflammation et des réactions immunes). Il existe une dizaine de types d'interleukines (IL), des facteurs de croissance ainsi que des chimiokines ont été identifiés à participer au rejet d'allogreffe. L'IL-1 est une cytokine proinflammatoire produite par les macrophages activés par le TNF- α (*tumor necrosis factor- α*), et elle stimule le recrutement leucocytaire au site de l'inflammation, voire dans le greffon. Elle suscite l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales vasculaires, et stimule les cellules endothéliales et les macrophages à sécréter des chimiokines. L'IL-1 favorise aussi l'activation des lymphocytes T et B, et elle est responsable de la fièvre observée lors du rejet d'allogreffe. L'IL-2 est une cytokine de type Th1 qui joue un rôle très important dans le rejet aigu. Sécrétée majoritairement par les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺, elle est le facteur de croissance des lymphocytes T stimulés par l'alloantigène, et elle est responsable de l'expansion clonale des lymphocytes T après la reconnaissance allogénique. L'IL-2, produite par les lymphocytes T suite à la reconnaissance allogénique, est responsable de la prolifération des cellules spécifiques contre cet alloantigène. En outre, l'IL-2 induit la prolifération et la différenciation des lymphocytes B et des cellules NK (*natural killer*), et elle provoque la mort par apoptose chez certains lymphocytes T activés par l'alloantigène. En effet, une stratégie immunosuppressive efficace consiste à inhiber la production ou la fonction de l'IL-2 (par exemple, les inhibiteurs de la calcineurine et de mTOR

(*mammalian target of rapamycin*), et les anticorps contre le récepteur de l'IL-2). L'IL-4 est une cytokine de type Th2 sécrétée par les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺, et elle est la principale cytokine qui favorise la différenciation chez les lymphocytes B à produire des anticorps de type IgE. De plus, l'IL-4 stimule le développement des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en lymphocytes T de type Th2, et elle fonctionne comme facteur de croissance autocrine pour les lymphocytes T différenciés. L'IL-5 est produite par les lymphocytes T de type Th2 et les mastocytes. L'IL-5 induit la prolifération, la différenciation et l'activation des éosinophiles matures, et elle sert de lien entre la réponse inflammatoire causée par les éosinophiles et l'activation des lymphocytes T. L'IL-6, une cytokine de type Th2, est sécrétée par les monocytes/macrophages, les cellules endothéliales, les lymphocytes T activés et les fibroblastes en réponse à des microbes, à l'IL-1 ou au TNF- α . L'IL-6 favorise la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes, et elle contribue systématiquement à la phase aiguë de la réponse inflammatoire. L'IL-8 favorise le chimiotactisme chez les neutrophiles et l'IL-9 stimule les lymphocytes T. L'IL-10 est une cytokine sécrétée par les macrophages activés, et elle est impliquée dans l'homéostasie de la réponse inflammatoire et de l'immunité cellulaire. L'IL-10 inhibe les macrophages activés ainsi que leur production d'IL-12 et de TNF- α . En outre, l'IL-10 inhibe l'expression des molécules de costimulation et les molécules HLA de classe II, et la production d'IFN- γ (interféron- γ). L'IL-12 est une cytokine proinflammatoire qui est sécrétée par les macrophages et les cellules dendritiques, et elle est le principal médiateur de l'immunité cellulaire. L'IL-12 stimule les cellules NK et les lymphocytes T à produire l'IFN- γ , favorise la différenciation des lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ en lymphocytes T de type Th1, et amplifie les fonctions cytolytiques des cellules NK et des lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺. L'IL-13 est une cytokine qui inhibe la production des IL-1, IL-6 et IL-8, et du TNF- α , mais qui favorise la production d'IFN- γ . Dans une élégante étude, Strom et son équipe ont démontré que l'IL-15 régule le processus d'activation des lymphocytes T sous des aspects distincts de la régulation de l'IL-2, dans un modèle *in vivo*. En effet, les auteurs rapportent que l'IL-15 semble être un facteur de croissance essentiel à l'initiation de la division cellulaire du

lymphocyte T, tandis que l'unique rôle *in vivo* de l'IL-2 est de contrôler l'intensité de l'expansion clonale régulée par l'expression des chaînes γ à la surface des lymphocytes T entrant dans le cycle cellulaire (Li et al., 2001). Le TNF- α est une cytokine proinflammatoire qui est principalement produite par les macrophages et les lymphocytes T activés, mais aussi par les cellules NK et les mastocytes. La principale fonction du TNF- α est de stimuler le recrutement des neutrophiles et des monocytes aux sites de l'inflammation, voire dans le greffon. Il suscite l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales vasculaires (ligands des molécules d'intégrines et de sélectines), stimule les cellules endothéliales et les macrophages à sécréter des chimiokines et les macrophages à sécréter l'IL-1, et donc favorise davantage le recrutement leucocytaire au site du greffon. De plus, il a été rapporté que le TNF- α peut induire l'apoptose chez certaines cellules mais son rôle physiologique en est encore inconnu. L'IFN- γ est une cytokine proinflammatoire qui est sécrétée par les cellules NK, les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ et les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺. L'IFN- γ joue un rôle important dans le rejet d'organe puisqu'elle est principalement responsable de l'activation des macrophages tout en étant une cytokine effectrice des réponses immunes. L'IFN- γ stimule les macrophages à produire des radicaux libres et l'oxyde nitrique. Elle stimule aussi l'expression des molécules HLA de classe I et II, ainsi que des molécules costimulatrices exprimées sur les cellules présentatrices d'antigène. De plus, l'IFN- γ est un puissant activateur des cellules endothéliales vasculaires, et elle amplifie l'action du TNF- α sur l'endothélium à promouvoir l'adhésion et l'extravasation des lymphocytes aux sites inflammatoires. En plus de jouer un rôle dans l'inflammation, l'IFN- γ agit sur les lymphocytes B, et les incite à produire des anticorps de classe IgG, active les neutrophiles, stimule l'activité cytolytique des cellules NK et favorise la différenciation des lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ naïfs en lymphocytes T de type Th1 via la production d'IL-12. Le TGF- β est une cytokine produite par les lymphocytes T stimulés par l'alloantigène et les macrophages activés, mais aussi par d'autres types cellulaires. La principale action du TGF- β est d'inhiber la prolifération et

la différenciation des lymphocytes T et l'activation des macrophages. De plus, le TGF- β favorise la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire comme le collagène et les métalloprotéinases, et il participe à la réparation tissulaire voire peut contribuer au développement du rejet chronique. Du côté des chimiokines, les deux plus importantes sont RANTES (*regulated upon activation, normal T expressed, and secreted*) et MIP-1 α/β (*macrophage inflammatory proteins*), et elles sont produites par les leucocytes et divers types de cellules tissulaires comme les cellules endothéliales et épithéliales, et les fibroblastes. RANTES vient de la famille des CC-chimiokines, et elle joue un rôle dans l'inflammation en exerçant une attraction envers les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺, les lymphocytes T mémoires CD45RO⁺, les cellules NK, les monocytes, et les cellules dendritiques au site de l'inflammation. De toutes les chimiokines connues, RANTES est celle qui possède la plus grande intensité de chimiotactisme envers les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺. RANTES possède aussi une importante activité chimiotactique envers les éosinophiles et les basophiles. Le MIP-1 α/β vient aussi de la famille des CC-chimiokines. La chimiokine MIP-1 α exerce une activité chimiotactique principalement sur les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺, mais aussi les monocytes, les cellules dendritiques, les cellules NK et les éosinophiles, tandis que la chimiokine MIP-1 β attire et active plutôt les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ et les monocytes (Abbas et al., 2000; Krensky, 2001; Samson et al., 1999).

Rôle des chimiokines. La participation des chimiokines est primordiale dans la réponse inflammatoire observée lors du rejet aigu d'allogreffe. Les chimiokines sont une grande famille de cytokines à fonctions variées et de structure homologue qui stimulent les mouvements leucocytaires et régulent la transmigration des leucocytes du sang aux tissus. Les chimiokines sont de petites protéines de 6—15 KD avec des propriétés de liaison à l'héparine. À date, près de 50 chimiokines différentes ont été identifiées (Abbas et al., 2000; Coffman, 1998). La famille des chimiokines est divisée principalement en quatre groupes: les CC-chimiokines, CXC-les chimiokines, les C-chimiokines et les CX₃X-chimiokines (Samson et al., 1999). En général, les CXC-chimiokines (IL-8) agissent

majoritairement sur les neutrophiles tandis que les CC-chimiokines (MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-1 α , MCP-1 β et RANTES) stimulent préférentiellement les lymphocytes, les monocytes et les éosinophiles. Les CC-chimiokines et les CXC-chimiokines sont sécrétées par les leucocytes et les cellules tissulaires incluant les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales. Dans la plupart de ces cellules, la sécrétion de chimiokines est induite par l'action proinflammatoire de l'IL-1 et du TNF- α . En outre, plusieurs CC-chimiokines sont sécrétées par les lymphocytes T activés, constituant un lien direct entre l'immunité adaptative et le recrutement des leucocytes au site de l'inflammation (immunité innée). Les CC-chimiokines demeurent donc très importantes dans la réponse inflammatoire du rejet aigu d'allogreffe. D'autres cytokines impliquées dans le déplacement lymphocytaire sont sécrétées de manière constitutive dans les organes lymphoïdes. Toutes les chimiokines possèdent la propriété de se lier à l'héparane sulfate protéoglycan sur les cellules endothéliales, leur conférant ainsi la possibilité de stimuler les leucocytes circulants à adhérer à l'endothélium via les molécules d'adhésion.

1) Les CXC-chimiokines: La chimiokine la plus connue et la mieux étudiée dans cette sous-famille est l'IL-8. L'IL-8 possède une activité chimiotactique spécifique pour les neutrophiles, et elle est sécrétée par de nombreux types cellulaires incluant les cellules endothéliales, les fibroblastes, les neutrophiles, les lymphocytes et les hépatocytes. La sécrétion de l'IL-8 par les cellules endothéliales est directement impliquée dans l'adhérence des neutrophiles à l'endothélium. De plus, l'IL-8 augmente la perméabilité vasculaire et stimule la diapédèse des leucocytes activés. En outre, l'IP-10 et le Mig sont des peptides solubles, dont la sécrétion est induite par l'IFN- γ , qui exercent un chimiotactisme envers les lymphocytes.

2) Les CC-chimiokines: Le chef de file de la sous-famille des CC-chimiokines est le MCP-1, une cytokine qui possède une importante activité chimiotactique pour les monocytes, mais pas pour les neutrophiles. Il est responsable du recrutement des monocytes au site d'inflammation et induit l'expression des molécules intégrines à la surface des cellules endothéliales des capillaires sanguins, favorisant ainsi l'attachement des leucocytes circulants à l'endothélium vasculaire. Le MPC-1 est aussi chimiotactique pour les lymphocytes et les

cellules NK, en plus d'être un facteur puissant dans la sécrétion d'histamine des cellules basophiles. Les chimiokines MCP-2, MCP-3 et MCP-4 agissent aussi sur les monocytes. En outre, les chimiokines MIP-1 α exercent une activité chimiotactique sur les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺, mais aussi les monocytes, les cellules dendritiques, les cellules NK et les éosinophiles, tandis que la chimiokine MIP-1 β attire et active plutôt les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ et les monocytes. RANTES est un autre membre de la famille CC-chimiokines et il attire les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ et mémoires CD45RO⁺, les cellules NK et les cellules dendritiques. Comparativement à toutes les chimiokines connues, RANTES est celle qui induit la plus forte intensité de chimiotactisme envers les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺. RANTES exerce aussi une importante activité chimiotactique sur les éosinophiles et les basophiles. En somme, les chimiokines attirent une grande variété de cellules immunitaires vers le site de l'inflammation, et contribuent donc à leur recrutement au niveau de l'allogreffe. À date, il existe plus de 10 récepteurs distincts de chimiokines CC (appelés CCR1-CCR10) et 6 récepteurs de chimiokines CXC (appelés CXCR1-CXCR6). Les récepteurs de chimiokines sont exprimés à la surface des leucocytes, et particulièrement en grande quantité et variété sur les lymphocytes T. Les récepteurs de chimiokines font partie de la famille des récepteurs couplés à la protéine G. Lorsque le récepteur est occupé par le ligand de la chimiokine, il agit comme un échangeur du GTP, c'est-à-dire qu'il remplace les groupements GDP par le GTP. La forme GTP-protéine G permet l'activation de plusieurs enzymes, notamment celles responsables dans la migration cellulaire (Abbas et al., 2000; Coffman, 1998).

ANNEXE 4:

MÉDIATEURS DE L'INFLAMMATION*

**Résumé de Coffman, 1998; Brody, 1998; Abbas et al., 2000.*

Médiateurs lipidiques dérivés de l'acide arachidonique. Plusieurs molécules actives sont les produits résultant du métabolisme de l'acide arachidonique, un acide gras non-saturé présent dans la membrane phospholipidique. Les médiateurs lipidiques (aussi appelés eicosanoïdes), incluant les thromboxanes, les prostaglandines, les leukotriènes et le facteur d'activation des plaquettes, sont synthétisés via des voies enzymatiques spécifiques. Il existe notamment deux principales voies enzymatiques du métabolisme de l'acide arachidonique qui sont impliquées dans la réponse inflammatoire: la voie de la cyclooxygénase (produisant les prostaglandines et les thromboxanes) et la voie de la 5-lipoxygénase (produisant les leukotriènes). L'acide arachidonique est libéré de la membrane phospholipidique sous l'action de la phospholipase A₂ (Coffman, 1998). Cet enzyme est régulé par plusieurs hormones et cytokines, incluant l'IL-1 et le TNF- α . Voici un bon exemple démontrant l'efficacité des cytokines proinflammatoires à amplifier davantage la réponse inflammatoire. 1) Voie de la cyclooxygénase: Les principales eicosanoïdes issues de cette voie et produites par les mastocytes activés sont les prostaglandines D₂. Les prostaglandines D₂ se lient aux récepteurs des cellules musculaires lisses, et induisent une bronchoconstriction et une vasodilatation. Les prostaglandines D₂ possèdent aussi une activité chimiotactique et attirent les neutrophiles sur le site d'inflammation. La thromboxane A₂ est également produite par la voie de la cyclooxygénase. Elle est un vasoconstricteur puissant qui stimule l'agrégation plaquettaire. De ce fait, elle réduit considérablement le flot sanguin au niveau de l'inflammation et cause des occlusions vasculaires. Cependant, les prostaglandines E₂ et la prostacycline semblent avoir des effets contraires à ceux de la thromboxane A₂, c'est-à-dire qu'elles inhibent l'agrégation plaquettaire et sont de puissants vasodilatateurs. 2) Voie de la 5-lipoxygénase: Les principales eicosanoïdes

issues de cette voie, produites par les mastocytes et les basophiles activés, sont les leukotriènes B₄ et C₄, et leurs sous-produits de dégradation, les pseudoleukotriènes. Les leukotriènes B₄ ont été rapportés à promouvoir l'adhésion leucocytaire à l'endothélium vasculaire, à faciliter la production de cytokines proinflammatoires telles l'IL-1, l'IL-2 et l'IFN-γ, en plus d'induire l'expression des molécules MHC spécifiques à l'alloantigène à la surface des cellules présentatrices d'antigènes. Les pseudoleukotriènes sont reconnus comme étant de puissants vasoconstricteurs qui peuvent altérer la perméabilité vasculaire, et ils peuvent induire l'expression des molécules intégrines à la surface des cellules endothéliales. De plus, ces pseudoleukotriènes sont des médiateurs de l'anaphylaxie, jouant un rôle primordial dans la bronchoconstriction chronique observée dans les maladies respiratoires (Coffman, 1998). 3) Facteur d'activation des plaquettes: Le facteur d'activation des plaquettes est le troisième type de médiateur dérivé des phospholipides membranaires. Il est libéré des mastocytes et des basophiles, et il possède des propriétés vasodilatatrices et de bronchoconstriction. De plus, il semble être d'une grande importance lors de réactions d'hypersensibilité tardives puisqu'il peut stimuler l'activation de leukotriènes proinflammatoires (Abbas et al., 2000).

Autres médiateurs de l'inflammation. 1) Histamine: Lorsqu'ils sont activés, les mastocytes, les éosinophiles et les plaquettes libèrent de leurs granules l'histamine au site inflammatoire. L'histamine est une amine biogénique qui est déjà préformée et mise en réserve dans des granules. L'histamine libérée induit une augmentation de la perméabilité vasculaire et stimule la contraction des cellules musculaires lisses (par exemple, la bronchoconstriction). 2) Sérotonine: Comme l'histamine, la sérotonine est une amine vasoactive qui augmente la perméabilité vasculaire et cause la contraction des cellules musculaires lisses. Elle est produite par les mastocytes et les plaquettes. 3) Bradykinine: Un autre médiateur de l'inflammation est la bradykinine. La bradykinine et la kallidine sont des kinines présentes dans le sang, et elles induisent la perméabilité vasculaire, la vasodilatation (via la production de l'oxyde nitrique), la contraction des cellules musculaires lisses, la production des prostaglandines et la stimulation des

récepteurs sensoriels de la douleur. 4) Facteurs de coagulation: La rougeur est un des cinq signes de l'inflammation et elle implique la congestion vasculaire, c'est-à-dire la coagulation. Les facteurs de coagulation sont d'ailleurs considérés comme étant des médiateurs de l'inflammation. Lorsqu'il y a adhésion plaquettaire (par exemple, sous l'action de la thromboxane A_2), le facteur de Hageman présent dans le sang devient activé. Le facteur de Hageman assure la première étape de coagulation, joue un rôle dans la production des kinines et favorise l'adhésion des leucocytes. Un autre facteur de coagulation est la thrombine, dont l'activation est induite par la prothrombine. La thrombine favorise la libération de la sérotonine des plaquettes et elle catalyse la transformation du fibrinogène en fibrine. Cette dernière est le troisième facteur de coagulation et une de ses fonctions consiste à exercer un effet chimiotactique sur les leucocytes (Brody et al., 1998). Malgré que l'oxyde nitrique ne soit pas considéré comme un médiateur direct de l'inflammation, sa propriété vasodilatatrice peut amplifier la réponse inflammatoire. Lorsque les cellules endothéliales sont activées, elles produisent de l'oxyde nitrique. Comme l'oxyde nitrique est un bon vasodilatateur, il augmente le flot sanguin et permet à un plus grand nombre de cytokines et de cellules proinflammatoires de se rendre sur les lieux de l'inflammation pour amplifier la réponse, c'est-à-dire de se rendre dans l'allogreffe et en causer sa destruction.

ANNEXE 5: **HISTORIQUE ET ÉVOLUTION DE L'IMMUNOSUPPRESSION***

**Résumé de Halloran et al., 2001a ; Ma et al., 2002; Hong et al., 2000.*

Dans les années 50, le concept d'immunosuppression était bien simpliste. Il ne se référait point à la notion de spécificité des réponses immunes, mais consistait plutôt à réduire l'inflammation. Le développement de l'hormone adénocorticotropique et des corticostéroïdes démontra que les désordres inflammatoires (par exemple, l'arthrite rhumatoïde, le syndrome néphrétique et les allergies) peuvent être améliorés suite à un traitement de stéroïdes. De ce fait, il était légitime de croire que les glucocorticoïdes peuvent prévenir et traiter contre l'inflammation sévère observée lors du rejet d'organe expérimental. Au cours de cette décennie, quelques transplantations rénales ont été effectuées, et les résultats furent désastreux puisque les patients recevaient peu ou aucune immunosuppression. Comparativement à l'évolution des techniques chirurgicales, la connaissance de l'immunosuppression prenait du retard et la première transplantation rénale à être réussie était due au fait que le donneur et le receveur étaient des jumeaux identiques. À la fin des années 50, les premières tentatives d'irradiation corporelle pour prolonger la survie des allogreffes furent rapportées. L'historique de l'immunosuppression peut être divisé en cinq grandes époques chronologiques. 1) L'azathioprine, la globuline antilymphocytaire, et les mesures physiques: Vers la fin des années 50, il y eut un déploiement dans les traitements immunosuppresseurs pour traiter contre le rejet d'allogreffes cadavériques. Le 6-mercaptopurine et l'azathioprine furent développés et démontrés à posséder la capacité d'altérer les réponses immunes contre l'allogreffe. Au début des années 60, l'utilisation de fortes doses de glucocorticoïdes en association avec l'azathioprine fut introduite en clinique, mais ne permettait qu'un faible taux de succès en transplantation avec donneur cadavérique. La première application de la globuline antilymphocytaire fut également introduite en clinique. En outre, de nombreux efforts furent déployés pour

causer une déplétion des cellules immunitaires à l'aide des techniques de drainage thoracique, d'irradiation, de thymectomie et de splénectomie. Au cours des années 70, la thérapie de la globuline antilymphocytaire de Minnesota apporta une amélioration de la survie des allogreffes. Cependant, le taux de survie des allogreffes rénales cadavériques resta inférieur à 50% à un an posttransplantation, et les fortes doses de stéroïdes causèrent d'importants effets secondaires chez les patients. À cette époque, la survie d'allogreffes d'autres types d'organes demeurait faible, et seule la transplantation rénale fut effectuée de manière significative. 2) Ère de la cyclosporine: La découverte de la cyclosporine par Jean-François Borel, la première utilisation clinique de cette molécule en 1978, et son application croissante au cours des années 80 contribuèrent à l'amélioration considérable dans le domaine de la transplantation. Les nombreuses études effectuées pour comprendre le mécanisme d'action de la cyclosporine ont permis d'identifier que cet agent inhibe l'activité transcriptionnelle de l'IL-2 et d'autres cytokines chez le lymphocyte T. Ceci fut une contribution significative à la compréhension de l'activation du lymphocyte T au niveau fondamental. Outre la cyclosporine, la découverte d'anticorps polyclonaux antilymphocytaires (connu plus tard comme étant l'agent muromonab-CD3), permettant de réduire les grandes doses de stéroïdes et l'amélioration des soins médicaux, chirurgicaux, intensifs et de gestions hospitalières, permirent l'obtention de meilleurs résultats cliniques, voire l'élaboration d'essais cliniques à large spectre. Le progrès en transplantation cardiaque, hépatique, pancréatique et pulmonaire créa les programmes de transplantation qui existent encore aujourd'hui. 3) Les anticorps muromonab-CD3: Dans la même période des années 80, le développement de l'anticorps de souris anti-CD3, le muromonab-CD3, et son introduction en clinique amenèrent une nouvelle étape à l'immunosuppression. L'objectif majeur d'élaborer des anticorps monoclonaux est d'éviter les effets indésirables secondaires à l'administration d'une grande quantité de protéines étrangères telles que rencontrées avec des préparations d'anticorps polyclonaux. Le muromonab-CD3 est administré comme thérapie d'induction seulement. Puisque 50% des patients traités répétitivement au muromonab-CD3 développent des anticorps

anti-idiotypiques contre ces anticorps monoclonaux, le muromonab-CD3 est donc réservé aux patients qui n'ont jamais ou peu souvent eu recours au traitement. De plus, cela évite l'incidence d'infections opportunistes et de cancers d'un tel traitement puissant.

4) Le tacrolimus, le mycophénolate mofétil, et le sirolimus: L'observation que le tacrolimus agit via le même mécanisme d'action que la cyclosporine, et que ces deux agents requièrent la liaison à une immunophiline pour former un complexe qui inhibe l'enzyme calcineurine, déclencha une série de découvertes en recherche fondamentale. Les études effectuées sur la voie de la calcineurine permirent la découverte d'une nouvelle classe de facteurs de transcription, le NFAT. Vers la fin des années 80, le tacrolimus fut introduit en clinique en différenciant des autres agents immunosuppresseurs quant à son évaluation, puisqu'il fut testé à prime abord en transplantation hépatique au lieu de rénale. Le mycophénolate mofétil est un agent immunosuppresseur dérivé de l'acide mycophénolique, un agent développé comme inhibiteur de la synthèse de novo des purines chez les lymphocytes. Au début des années 90, les résultats des premières d'études cliniques démontrèrent la grande efficacité du mycophénolate mofétil à prévenir contre le rejet d'allogreffe, surtout lorsque combiné avec la cyclosporine. Le sirolimus, anciennement connu sous le nom rapamycine, fut découvert durant les années 70 comme étant un agent antifongique. Ses propriétés immunosuppressives ne furent reconnues que vers la fin des années 80. Au cours des années 90, le sirolimus fut développé comme agent immunosuppresseur et il fut utilisé en clinique en combinaison avec la cyclosporine. De nombreuses études cliniques multicentriques démontrèrent le potentiel du sirolimus à prévenir contre le rejet d'allogreffe, et ceci permit l'approbation de son utilisation en transplantation rénale.

5) Présent et futur: Depuis le début du nouveau millénaire, il y a eu un progrès considérable dans le développement de nouvelles protéines humanisées et chimériques, disponibles en transplantation. Les anticorps anti-CD25 (inhibiteurs du récepteur de l'IL-2) ont été développés pour prévenir contre le rejet d'allogreffe rénale. L'anti-CD40 ligand, le CTLA4-Ig et l'anticorps humanisé anti-CD3 sont des protéines intéressantes, mais elles doivent démontrer un meilleur profil en tant qu'immunosuppresseur (efficacité et effets

secondaires) qu'à celui des agents actuellement utilisés en clinique. De plus, les agents bloqueurs de récepteurs de chimiokines et de molécules d'adhésion (par exemple, des agents anti-ICAM-1, anti-PSGL-1, et anti-VLA-4) sont explorés de façon expérimentale pour leur indication dans la prévention du rejet d'allogreffe. Le leflunomide et ses analogues malononitrilamides (le FK778), la déoxyspergualine et ses analogues (le trespérinus et le LF15-0195), les inhibiteurs du signal de transduction (par exemple, la tépoxaline, le SP100030 et le A802715) et le FTY720 représentent également des molécules non-biologiques de faible poids moléculaires potentielles. Avec la thérapie génique et la technologie d'antisense, une nouvelle classe d'agents a vu le jour tels les peptides et les oligonucléotides antisenses, mais leur potentiel clinique demeure encore sous intense évaluation.

ANNEXE 6:**THÉRAPIES IMMUNOSUPPRESSIVES: UN SURVOL ***

**Résumé de Halloran et al., 2001b; Ma et al., 2002; Morris, 1998; Light et al., 2001; Brennan, 2001.*

Les thérapies immunosuppressives sont divisées en deux grandes classes: les thérapies physiques et les thérapies pharmaceutiques. Les thérapies physiques datent depuis longtemps, et elles consistent à altérer ou ablater les organes et les tissus du système immunitaire pour détruire les lymphocytes. Les thérapies immunosuppressives physiques sont l'irradiation corporelle totale ou des organes lymphoïdes, le drainage thoracique, la splénectomie et la thymectomie. À part leur utilisation dans des protocoles expérimentaux d'induction de tolérance, les thérapies physiques ne sont plus utilisées comme traitement contre le rejet d'organes solides, puisqu'ils existent des moyens moins drastiques, plus spécifiques voire mieux tolérés. Les thérapies immunosuppressives pharmaceutiques peuvent être divisées en deux sous-classes: les agents à faible poids moléculaire (ou molécules non-biologiques) et les agents biologiques comme les protéines, les peptides, les oligonucléotides et les agents issus de la thérapie génique. Les agents biologiques et non-biologiques ont leurs propres avantages et désavantages. Les protéines sont très spécifiques et causent peu d'effets secondaires, mais elles ne peuvent pas traverser les membranes cellulaires, et elles sont donc limitées à interagir avec des molécules de surface. De plus, elles doivent être administrées de manière parentérale et leur demi-vie est normalement très longue. Contrairement aux agents biologiques, les molécules à faible poids moléculaire peuvent traverser la membrane cellulaire, et elles inhibent habituellement des protéines enzymatiques hautement conservées. À date, très peu de protéines ont été identifiées à être les cibles des agents non-biologiques. Le plus grand désavantage des molécules non-biologiques est qu'elles exercent ses effets immunosuppresseurs via le même mécanisme d'action qu'elles entraînent ses effets secondaires (Halloran et al., 2001b).

Les agents à faible poids moléculaire: Dans la sous-classe des agents à faible poids moléculaire, on retrouve les glucocorticostéroïdes. Ces agents ont été utilisés continuellement depuis le début de la transplantation d'organes jusqu'à aujourd'hui. Les glucocorticoïdes (cortisol, cortisone, prednisone, prednisolone, 6 α -méthylprednisolone) exercent des effets immunosuppresseurs et antiinflammatoires puissants en agissant sur les lymphocytes T et B, les macrophages/monocytes, les granulocytes, et les cellules endothéliales. Leur principal mécanisme d'action consiste à causer une régulation positive du facteur de transcription I κ B ou une régulation négative des facteurs de transcription NF κ B et AP-1, et ainsi altérer l'expression des gènes responsables de la production des facteurs clés responsables de l'induction et la maintenance des réponses immunes et inflammatoires (par exemple, l'IL-1, l'IL-2, l'IL-3, l'IL-6, l'IFN- γ , le TNF- α , les molécules d'adhésion et les molécules MHC). Les effets secondaires des glucocorticoïdes sont d'ordre esthétique (par exemple, l'hirsutisme, l'acné, les ecchymoses, et l'obésité) et métabolique (par exemple, l'hyperlipidémie, le diabète, la rétention d'eau, l'ostéopénie, et le retard de croissance chez l'enfant), en plus de causer l'hypertension, les ulcères gastriques, les cataractes, la myopathie, le risque d'infections opportunistes et la diminution de l'activité de réparation tissulaire (Cohen, 2001). Une deuxième catégorie d'agents à faible poids moléculaire implique les molécules se liant aux immunophilines, à savoir les inhibiteurs de la calcineurine (la cyclosporine et le tacrolimus) et les inhibiteurs de mTOR (le sirolimus et RAD). Ces agents doivent se lier à des ligands intracellulaires ubiquitaires appelés immunophilines (cyclophiline ou FKBP12) afin de former un complexe qui va se lier à une protéine multifonctionnelle ayant une activité enzymatique et jouant un rôle important dans l'activation et la prolifération des lymphocytes. Les effets secondaires de ces agents sont significatifs, et ils sont souvent dus à l'interaction de ces molécules non-biologiques avec la même protéine qui est responsable des effets immunosuppresseurs, restreignant ainsi leur utilisation à de faibles doses, voire en combinaison avec d'autres agents immunosuppresseurs. Dans cette sous-classe, on retrouve aussi la catégorie des

inhibiteurs de la synthèse *de novo* de nucléotides, incluant les inhibiteurs de la synthèse des purines (le mycophénolate mofétil, l'acide mycophénolique et le mizoribine) et les inhibiteurs de la synthèse des pyrimidines (le leflunomide, les malononitrilamides et le bréquinar). Le mizoribine a été démontré à être plus efficace et moins toxique que l'azathioprine. Actuellement, l'utilisation clinique du mizoribine se fait seulement au Japon puisque l'Amérique du Nord et l'Europe ont plutôt opté pour le mycophénolate mofétil. Le bréquinar, un inhibiteur de la synthèse des pyrimidines, est très efficace à prolonger la survie des allogreffes chez les rongeurs, mais il semble moins efficace chez les primates (Morris, 1998). L'azathioprine est une pro-drogue du 6-mercaptopurine, et elle est un agent antimétabolite utilisé dans le traitement des leucémies et des tumeurs à croissance rapide. L'azathioprine est un inhibiteur compétitif de la voie *de novo* et de la voie de récupération de la synthèse des purines. Il bloque autant la synthèse d'ADN et d'ARN en s'interférant entre les acides nucléiques. Comme l'azathioprine n'agit pas de façon spécifique, il inhibe la prolifération cellulaire en général, entre autre celle des lymphocytes T et B. La conséquence non spécifique d'une rupture chromosomique, d'une distorsion d'acides nucléaires et d'une interférence avec la réparation de l'ADN conduit ainsi à un taux élevé de transformations malignes. Les effets secondaires majeurs de l'azathioprine sont la suppression de la moelle osseuse, la cytopénie, la leucopénie, l'hépatite toxique idiosyncrasique, la pancréatite aiguë, et les cancers de la peau. Il semble que certaines ethnies (par exemple, les Asiatiques) sont plus susceptibles à ces toxicités en raison d'un polymorphisme au niveau des gènes codant pour les enzymes impliqués dans la dégradation du 6-mercaptopurine. Une accumulation de l'agent et de son métabolite actif est normalement observée chez ces ethnies. Les patients sous azathioprine doivent habituellement prendre une médication additionnelle pour stimuler la moelle osseuse (par exemple, le filgrastim ou l'érythropoétine) afin d'éviter une cytopénie ou une leucopénie persistante, et ainsi occasionner plus de risque d'infections opportunistes (de Mattos, 2001). La cyclophosphamide est également un inhibiteur de la synthèse de nucléotides, et donc un inhibiteur de la prolifération cellulaire, particulièrement les lymphocytes B.

Cependant, les toxicités reliées à la prise de ce médicament sont très importantes, et elles limitent son utilisation en transplantation (Starzl et al., 1971). La cyclophosphamide est surtout utilisée expérimentalement pour traiter contre le rejet de xénogreffe. Un autre agent inhibiteur de la synthèse des nucléotides est le 15-déoxyspergualine (aussi appelé guspérinus), un analogue d'un agent anti-cancéreux, la spergualine. *In vitro*, l'agent 15-déoxyspergualine ne possède pas ou très peu d'activité inhibitrice sur la prolifération. Par contre, *in vivo*, il prolonge significativement la survie des allogreffes. Cependant, les mécanismes par lesquels le 15-déoxyspergualine affecte la fonction effectrice des lymphocytes T et B demeurent encore inconnus. Récemment, il a été rapporté que le 15-déoxyspergualine se lie à une protéine cytosolique de la famille des HSP (*heat shock protein*), le Hsc70. Il semble que les protéines HSP soient impliquées dans l'activation lymphocytaire, et qu'elles possèdent un domaine de liaison peptidique et une ATPase. Comme le domaine de liaison peptidique du Hsc70 est similaire à celui de la molécule MHC de classe I, il est probable que le Hsc70 entre en compétition avec la molécule MHC pour se lier à la cellule présentatrice d'antigène (Morris, 1998). Depuis sa découverte, l'effet du 15-déoxyspergualine a été évalué dans plusieurs modèles animaux d'allogreffes et de xénogreffes, de maladie du greffon contre l'hôte, et les maladies autoimmunes (Ma et al., 2002). Depuis 1994, le 15-déoxyspergualine est utilisé en transplantation rénale clinique, au Japon seulement. Le trespérinus est un analogue du 15-déoxyspergualine, et il inhibe la maladie du greffon contre l'hôte suite à une transplantation allogénique. Le trespérinus se lie à la protéine Hsc70 et altère la voie du NFκB. Il est présentement en étude clinique de phase I-III dans la prévention de la maladie du greffon contre l'hôte chez des patients ayant reçu une greffe de moelle allogénique (Ma et al., 2002). Le LF15-0195 est un analogue du 15-déoxyspergualine qui a été rapporté à être plus efficace et mieux toléré que la molécule originale. En effet, il a été rapporté que le LF15-0195 peut prévenir contre le rejet d'allogreffe et induire une tolérance spécifique au donneur impliquant les cellules dendritiques dans un modèle de transplantation cardiaque chez le rat, ainsi que prévenir le rejet d'allogreffe rénale chez le primate non-

humain (Ma et al., 2002). Le FTY720 est un agent unique qui est la structure synthétique de l'analogue de la myriocine (ISP-1), un dérivé fongique de *Isaria sinclairii*. Le mécanisme d'action du FTY720 est complètement différent de celui des immunosuppresseurs actuellement connus. Initialement, on croyait que le mécanisme d'action du FTY720 impliquait l'apoptose des lymphocytes. Cependant, il a été démontré par Brinkmann et al. (2001) que le FTY720 module le signal chimiotactique des chimiokines aux lymphocytes, et qu'il induit une séquestration des lymphocytes dans les organes lymphoïdes secondaires (par exemple, les ganglions lymphatiques et les plaques de Peyer), inhibant ainsi les lymphocytes à réagir et à migrer vers les chimiokines inflammatoires au site de l'allogreffe. De façon intéressante, ceci se produit sans que les réponses immunes contre les infections systémiques ne soient altérées. La première étude clinique révèle que le FTY720 est bien toléré chez des patients transplantés rénaux stables. Cependant, il semble que le FTY720 cause une bradycardie asymptomatique temporaire et une lymphopénie dose-dépendante réversible. Ces résultats prometteurs démontrent la capacité du FTY720 à être sécuritaire et efficace en transplantation d'organes (Budde et al., 2002). Il existe des nouveaux agents non-biologiques très attrayants, et qui sont pour la plupart sous investigation préclinique ou clinique de phase I. Dans la catégorie des inhibiteurs de la synthèse des nucléotides, on retrouve le VX-497 (un inhibiteur de la synthèse *de novo* des purines), les malononitrilamides (des inhibiteurs de la synthèse *de novo* des pyrimidines) et le BCX-34 (un inhibiteur de la synthèse *de novo* des purines). Les bloqueurs potassiques, incluant le TEA, le 4-AP, la charybdotoxine, la margatoxine, le CP-339,818 et le ShK-Dap²², sont une nouvelle catégorie d'agents immunosuppresseurs à faible poids moléculaire. Durant l'activation du lymphocyte T, des concentrations élevées de calcium intracellulaire sont requises pour activer l'expression des gènes. Après la stimulation du TCR, la formation d'IP₃ cause la libération de calcium intracellulaire des réserves calciques. Les réserves vides occasionnent un influx calcique via les canaux calciques dépendant du calcium, lesquels sont maintenus par des canaux potassiques dépendant du voltage qui conservent la membrane du lymphocyte T polarisée. Ainsi,

en bloquant ces canaux potassiques, on prévient le remplissage des réserves calciques, on maintient les concentrations calciques intracellulaires basses, voire on empêche l'activation des lymphocytes T. Il existe aussi d'autres nouveaux agents qui bloquent le signal 1 (activation via le TCR): Les inhibiteurs du facteur de transcription NFκB. Le SP100030 (inhibe aussi AP-1) et la tépoxaline inhibent NFκB, un facteur reconnu pour induire la transcription des gènes de l'IL-1, l'IL-2, l'IL-6, l'IL-8, du TNF-α et des molécules d'adhésion (par exemple, la E-sélectine, le Mac-1, et le VCAM-1). De plus, on retrouve les inhibiteurs de protéines tyrosines kinases tels la genistéine (un isoflavanoïde), l'herbimycine A et le PT1 (un dérivé synthétique de la genistéine). Enfin, dans la catégorie des nouveaux agents à faible poids moléculaire, on retrouve les inhibiteurs du signal 2 (costimulation), tels les dérivés méthylxanthine (la théophylline, la pentoxifylline et le A802715). Ces agents bloquent l'activité AMP cyclique phosphodiesterase et inhibent ainsi la prolifération des lymphocytes T en réponse aux alloantigènes et mitogènes, la génération de lymphocytes T cytotoxiques et la cytolyse par les cellules NK (Klupp et al., 2001). Malgré l'amélioration des résultats en transplantation d'organes avec l'utilisation des agents immunosuppresseurs de faible poids moléculaire, les futures directions dans le développement de nouveaux agents à faible poids moléculaire seraient de disposer de molécules immunosuppressives ayant quatre aspects importants, dont 1) un mécanisme d'action sélectif envers les réponses immunes adaptatives, et non les réponses immunes innées afin d'éviter les infections opportunistes et les complications néoplasiques; 2) une cible moléculaire restreinte aux cellules lymphoïdes afin d'éviter les effets indésirables sur d'autres types de cellules, de tissus ou d'organes; 3) une interaction synergique avec d'autres agents immunosuppresseurs conventionnels; et 4) une voie métabolique de biotransformation distinct de l'isoforme 3A4 du cytochrome P450 afin de minimiser les interactions médicamenteuses qui affectent les relations dose-effet (Kahan, 2002).

Les agents biologiques: La sous-classe des agents biologiques inclut les anticorps, les peptides, les oligonucléotides antisenses, voire les agents issus de la thérapie

génique. Les anticorps polyclonaux antilymphocytaires demeurent la plus ancienne thérapie immunosuppressive de l'histoire de la transplantation, puisqu'ils ont été utilisés au début du siècle dernier comme agents antiinflammatoires, et ils ont été démontrés, par la suite, à réduire les réactions d'hypersensibilité de type retardé et le rejet de greffe de peau dans des modèles expérimentaux. Les anticorps polyclonaux sont composés de plusieurs immunoglobulines qui sont produits par différents clones de cellules. Il existe plusieurs types de préparations d'anticorps polyclonaux antilymphocytaires (par exemple, la globuline antilymphocytaire de Minnesota (MALG), Atgam®, lymphoglobulin®, Thymoglobulin®, et F-ATG®), et ils diffèrent entre eux dans le choix de l'immunogène (les thymocytes, les lymphoblastes ou la lignée cellulaire Jurkat), l'espèce animale dans laquelle l'immunoglobuline est générée (le cheval ou le lapin), la pureté de la préparation, les cellules ciblées, la dose et l'intensité de la préparation. Les anticorps polyclonaux antilymphocytaires causent une déplétion des lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ et cytotoxiques CD8⁺ par différents mécanismes (par exemple, la lyse et l'opsonisation dépendante du complément, l'opsonisation dépendante de la liaison au Fc, et l'apoptose via Fas et Fas-ligand), en plus d'éliminer des lymphocytes mémoires non-circulants préactivés. En théorie, un traitement d'anticorps polyclonaux antilymphocytaires peut prévenir plus efficacement le rejet aigu d'allogreffe comparativement à une thérapie d'anticorps monoclonal, puisqu'il contient des anticorps contre une grande variété d'antigènes de lymphocytes T et B, de cellules NK et de molécules d'adhésion ou de costimulation. Les principaux effets secondaires des anticorps polyclonaux antilymphocytaires sont la fièvre et les frissons secondaires au syndrome de libération de cytokines, et une faible thrombocytopénie et leucopénie réversible. Actuellement, les seules préparations d'anticorps polyclonaux antilymphocytaires reconnues par le FDA sont les agents Thymoglobulin® et Atgam®, mais uniquement comme thérapie d'induction dans la prévention du rejet d'organes (Brennan, 2001). Dans la catégorie des anticorps, on retrouve aussi le muromonab-CD3, un anticorps monoclonal de souris de la classe des IgG_{2a} qui se lie avec la chaîne ξ du récepteur CD3 sur les lymphocytes T, et qui cause

ainsi l'inactivation des cellules CD3⁺. En effet, le complexe CD3 sert d'unité de signal de transduction et il est intimement relié au TCR. Lorsque le TCR reconnaît un antigène, CD3 transmet un signal pour activer le lymphocyte. Or, muromonab-CD3 inhibe spécifiquement les lymphocytes issus du thymus, c'est-à-dire les lymphocytes CD3⁺ qui ont rencontré les alloantigènes. Il semble que muromonab-CD3 cause une endocytose de la molécule CD3. Les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ et cytotoxiques CD8⁺ ne sont pas inactivés et peuvent ainsi défendre l'organisme contre les infections virales et microbiennes. Actuellement, le muromonab-CD3 n'est administré aux patients transplantés comme thérapie d'induction et traitement pour renverser les épisodes de rejet aigu seulement, puisque sa réponse est très vigoureuse. Lorsque le patient reçoit le traitement de muromonab-CD3, le syndrome de libération de cytokines (le TNF- α , l'IL-2 et l'IFN- γ) peut se manifester et causer des maux de tête, de la fièvre, des tremblements, des dyspnées, des nausées et des vomissements. Malgré ces effets secondaires fugaces, le muromonab-CD3 est bien efficace pour traiter contre les épisodes de rejet aigu chez des patients transplantés. Cependant, l'obstacle majeur de cette thérapie est que 50% des patients traités au muromonab-CD3 de façon répétée développent des anticorps antiidiotypiques contre ces anticorps monoclonaux. Le muromonab-CD3 est donc réservé aux patients qui n'ont jamais ou peu souvent eu recours au traitement. Le HuM291 est un anticorps monoclonal de souris anti-CD3 sous forme humanisée, c'est-à-dire que l'ADN complémentaire du domaine hypervariable des chaînes lourdes et légères de l'anticorps anti-CD3 murin a été cloné avec l'ADN complémentaire du domaine constant d'un IgG2 humain. Cela diminue l'intensité du syndrome de libération des cytokines ainsi que les risques que les patients ne développent des anticorps antiidiotypiques, tel qu'observé avec le muromonab-CD3. La demi-vie de l'anticorps monoclonal humanisé devient alors plus longue. Le HuM291 est présentement sous investigation clinique (Norman, 2001b). Dans la sous-classe des agents biologiques, on retrouve deux anticorps monoclonaux anti-CD25 (ciblant la chaîne α du récepteur de l'IL-2) humanisés et chimériques, respectivement le daclizumab (Zenepax) et le basiliximab (Simulect). Le mécanisme d'action de ces

anticorps monoclonaux anti-CD25 consiste à bloquer la liaison de l'IL-2 à la chaîne α du récepteur de l'IL-2, et interférer avec la prolifération cellulaire dépendante de l'IL-2. Le daclizumab et le basiliximab sont tous deux approuvés par le FDA (Vincenti, 2001). Des anticorps monoclonaux anti-CD40 ligand sous forme humanisée sont également sous investigation préclinique (transplantation d'organes chez les rongeurs et le primate non-humain) avec des résultats très convaincants. Cependant, des études cliniques de phase I chez des patients transplantés rénaux ont démontré qu'un traitement au Hu568 ou au 5C7 provoque une incidence inacceptable de thromboses veineuses et artérielles en plus d'être moins efficace à inhiber le rejet aigu qu'anticipé. Ces résultats ont mis un terme à l'étude. Les protéines de fusion font également partie de la sous-classe des agents immunosuppresseurs biologiques. Les protéines de fusion sont développées en fusionnant le domaine de liaison extracellulaire de la protéine en question avec une région constante de l'IgG1 humaine. Le CTLA4Ig est une protéine de fusion recombinante qui a une plus grande affinité pour les molécules de surface B7-1 et B7-2 que ne possède le CD28. Un traitement de CTLA4Ig permet de prolonger la survie d'allogreffes dans des études animales, et il a été évalué chez des patients atteints de psoriasis. Cependant, il semble que des réactions anaphylactiques ont été observées. Une nouvelle construction de cette protéine de fusion est présentement sous évaluation en transplantation rénale (phase I clinique). Une autre protéine de fusion prometteuse est le rPSGL-Ig, un antagoniste de la P-sélectine. Le rPSGL-Ig est construit suite à la fusion du domaine de liaison extracellulaire du PSGL-1, le ligand principal de la P-sélectine, avec une région constante de l'IgG1 humaine. Le rPSGL-Ig a démontré plusieurs effets bénéfiques dans la prévention des dommages causés par l'ischémie/reperfusion. Son évaluation préclinique et clinique de phase I en combinaison avec d'autres immunosuppresseurs comme traitement préventif contre le rejet d'allogreffes est présentement en cours. Les immunotoxines sont un autre type d'agents immunosuppresseurs biologiques, et elles sont en investigation clinique depuis plus de deux décennies. Une immunotoxine est produite en liant un anticorps monoclonal spécifique à une toxine cellulaire. L'agent Ontak® est une immunotoxine

qui possède une IL-2 liée à la toxine de la diphtérie, et il est approuvé pour le traitement des lymphomes cutanés. Un anticorps anti-CD5 couplé au ricin a aussi été exploré en transplantation rénale et en greffe de moelle, mais sans succès puisque la toxicité était significative. De plus, un traitement d'immunotoxine anti-CD3 en combinaison avec le 15-déoxyspergualine a démontré à prévenir contre le rejet aigu et chronique chez des primates non-humains ayant reçu une allogreffe rénale. L'immunotoxine anti-CD3 cause une sévère déplétion des lymphocytes T, et la reconstitution lymphocytaire est lente. Une étude chez des patients transplantés rénaux est présentement en cours. Dans la catégorie des protéines, on retrouve en outre les IVIg qui sont très efficaces à traiter contre le rejet d'allogreffe de type humoral puisqu'ils inhibent la production d'anticorps via les récepteurs Fc. Il semble que les IVIg induisent une augmentation dans le catabolisme des anticorps IgG. Cependant, le mécanisme exact reste encore inconnu. Outre les protéines, on retrouve dans la sous-classe des agents biologiques, la catégorie des peptides et celle des oligonucléotides antisenses. Les peptides sont dérivés de protéines immunes, et ils sont utilisés pour inhiber les réponses correspondantes. Néanmoins, aucun peptide n'a encore démontré une efficacité dose-dépendante constante dans des modèles expérimentaux chez les animaux et chez les humains. Les oligonucléotides antisenses sont des agents prometteurs qui se lient à l'ARN messager de la protéine ciblée, et qui en cause sa dégradation. Le seul agent qui a démontré des résultats intéressants demeure l'oligonucléotide antisense contre la molécule d'adhésion ICAM-1. Tout comme pour les agents non-biologiques, il existe aussi des nouveaux agents biologiques très attrayants, qui sont pour la plupart sous investigation préclinique. Entre autres, on retrouve le rituximab (Rituxan®), un anticorps monoclonal anti-CD20 chimérique humain et souris, qui cible l'antigène CD20, retrouvé à la surface des pré-lymphocytes B normaux, des lymphocytes B matures normaux, et dans plus de 90% des lymphocytes B de lymphomes de non-Hodgkin, mais pas sur les cellules de souches hématopoïétiques, les pro-lymphocytes B, les plasmocytes normaux ou les cellules d'autres tissus. Le rituximab cause une lyse des lymphocytes B, l'apoptose chez les lignées cellulaires de lymphocytes B humains et une réduction significative des titres

d'anticorps sériques IgG et IgM. Le rituximab est approuvé dans le traitement du lymphome folliculaire de non-Hodgkin des lymphocytes B. On retrouve également des anticorps anti-molécules d'adhésion qui inhibent les interactions cellule-cellule et la costimulation, tels des anticorps anti-LFA-1 (ou anti-CD11a/CD18), anti-ICAM-1 (ou anti-CD54), anti-ICAM-2 (ou anti-CD102), anti-LFA-3 (anti-CD58), anti-CD2, anti-CD5, et anti-CD72. En effet, un anticorps monoclonal anti-CD11a (anti-LFA-1) humanisé a prouvé son efficacité à traiter le psoriasis, une maladie dermatologique induite par les lymphocytes T, et son potentiel à prévenir contre le rejet aigu est présentement sous évaluation clinique chez des patients transplantés rénaux. Enfin, il existe de nouvelles thérapies biologiques visant des cibles prometteuses comme le campath-1H, les bloqueurs d'IL-15 et les anticorps anti-CD45. Les anticorps anti-CD45 peuvent être des agents prometteurs pour prévenir contre le rejet aigu. Le complexe CD25 est une famille de protéines transmembranaires phosphatases tyrosines exprimées à la surface des cellules hématopoïétiques, et il semble jouer un rôle primordial dans le couplage des signaux du TCR et de la signalisation subséquente. Chez l'humain, le complexe CD25 existe en deux isoformes, le CD25RA (CD25RB^{Hi} chez la souris) et le CD25RO (CD25RB^{Lo} chez la souris). Les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ exprimant le CD25RA en surface sécrètent préférentiellement l'IL-2, tandis les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ exprimant le CD25RO vont plutôt sécréter l'IL-4. Il existe un anticorps monoclonal de souris anti-CD25RB, le MB23G2, qui a été démontré à inhiber l'alloréactivité des lymphocytes *in vitro*, à prévenir et renverser le rejet d'allogreffe, et à prolonger la survie des allogreffes à long terme dans des modèles de transplantation rénale et pancréatique chez la souris, ainsi que de transplantation rénale chez le primate non-humain. Le campath-1H est la forme humanisée du campath-1G, un anticorps monoclonal de rat anti-CD52. L'antigène CD52 est exprimé sur les lymphocytes T matures et sur certains lymphocytes B. Le campath-1G a été démontré à réduire les risques de rejet aigu chez des receveurs transplantés rénaux-pancréatiques et hépatiques. La forme humanisée, le campath-1H, a été développée pour réduire l'immunogénicité de l'anticorps et augmenter son efficacité et sa demi-vie. Le campath-1H cause une déplétion des

lymphocytes T et B du sang périphérique durant des semaines à des mois, et il est indiqué chez des patients atteints de leucémie lymphocytaire chronique et réfractaire. Le campath-1H a également été évalué en combinaison avec de faibles doses de cyclosporine dans la prévention du rejet d'allogreffe chez des patients transplantés rénaux, et les résultats en sont très encourageants. Enfin, il existe une autre cible potentielle, l'IL-15. Comme l'IL-2, l'IL-15 fait partie de la famille des facteurs de croissance du lymphocyte T. L'IL-15 partage plusieurs propriétés biologiques avec l'IL-2, et le récepteur de l'IL-15 possède les chaînes bêta et gamma du récepteur de l'IL-2. Ces chaînes sont exprimées sur les cellules NK, les lymphocytes B, et les mastocytes. L'évaluation de l'implication de l'IL-15 dans le rejet aigu et le potentiel pour réduire le rejet d'allogreffe en bloquant son action est présentement en cours de manière intense (Light et al., 2001; Halloran et al., 2001b).

ANNEXE 7:

TRANSPLANTATION D'ORGANES VASCULARISÉS CHEZ LE RAT

**Résumé de Chen et al., 1995a;1995b;1995c.*

Transplantation hétérotopique cardiaque chez le rat

Le premier modèle de transplantation hétérotopique cardiaque chez le rat a été décrit par Abbott et al. (Chen et al., 1995a). Cependant, ce modèle comportait beaucoup trop de dissections et d'altérations de l'anatomie et de la physiologie du receveur. Il consistait en l'anastomose de l'artère pulmonaire du cœur du donneur à la veine cave inférieure du receveur, et l'anastomose de l'aorte du cœur du donneur à l'aorte du receveur. En 1969, un modèle plus pratique fut introduit par Ono et Lindsey (Ono et al., 1969), et il demeure de nos jours la technique de transplantation hétérotopique cardiaque de référence chez les rongeurs. Notre groupe effectue les transplantations cardiaques selon cette technique, mais avec quelques modifications (Chen et al., 1995a).

Techniques chirurgicales. L'allogreffe cardiaque est placée de manière intraabdominale chez le receveur, selon la méthode d'Ono et Lindsey, mais avec quelques modifications (Chen et al., 1995a). Des anastomoses de type *end-to-side* sont effectuées entre l'aorte du donneur et l'aorte du receveur, et entre l'artère pulmonaire du donneur et la veine cave du receveur (Figure 1.9.2). La fonction de l'allogreffe cardiaque est évaluée par palpation abdominale quotidienne. Le temps de rejet (survie de l'allogreffe) est défini comme étant le dernier jour avant l'arrêt de l'activité cardiaque du greffon, et le rejet est confirmé par évaluation macroscopique de l'allogreffe après une laparotomie.

Physiologie de l'allogreffe cardiaque hétérotopique. Comme l'allogreffe cardiaque est implantée dans la cavité abdominale du receveur, le cœur hétérotopique est placé en circuit parallèle avec le cœur du receveur, de manière à ce qu'il soit perfusé

par le système cardiovasculaire du receveur. Durant la perfusion, les valves cardiaques du cœur hétérotopique demeurent fermées et les cavités cardiaques vides. La physiologie du cœur hétérotopique est sensiblement la même que celle d'un cœur isolé et perfusé de Langendorff (Döring et al., 1988), sauf qu'une solution physiologique (par exemple, une solution de Krebs) remplace le sang dans le cas du cœur isolé. Le cœur transplanté possède des aspects physiologiques particuliers qui sont importants à considérer au niveau clinique. Malgré l'amélioration des techniques chirurgicales, des méthodes de préservation et des traitements d'immunosuppression, la fonction de l'allogreffe cardiaque n'est point normale. Le cœur transplanté est dénervé et possède une physiologie altérée, causant des répercussions significatives chez le receveur. Une allogreffe cardiaque dénervée fait face à des altérations physiologiques incluant une diminution de la capacité contractile myocardique et des conditions de remplissage, un déséquilibre des niveaux de catécholamines circulantes, et une incompatibilité au niveau de la dimension du cœur entre le donneur et le receveur. Ces aspects sont responsables des paramètres hémodynamiques anormaux, incluant des restrictions physiologiques cardiaques et une augmentation de la fréquence cardiaque à l'état de repos. En outre, la dénervation cardiaque cause une altération dans le système de régulation rénine-angiotensine-aldostérone, et elle entrave à la réponse vasorégulatrice normale. Tous ces facteurs affectent la tolérance du receveur à l'exercice (Kobashigawa et al., 2001).

Modèle d'étude. La transplantation hétérotopique cardiaque est un modèle expérimental efficace utilisé dans plusieurs champs et domaines biomédicaux. Minanov et al. (1997) ont décrit cette méthode comme étant un excellent modèle pour l'étude de l'immunopathologie du rejet de l'allogreffe et de la xénogreffe. Chen et al. (1995a) ont suggéré que la transplantation hétérotopique cardiaque chez le rat soit probablement le modèle le plus utilisé pour des études de transplantation d'organes vascularisés. De plus, cette méthode permet d'évaluer les propriétés immunosuppressives des nouvelles molécules ou agents biologiques. Des études d'ischémie/reperfusion (Manneschi et al.,

1996; Perrault et al., 1997) et de cardioprotection (Duguay, et al., 1996) ont également été effectuées avec le modèle de transplantation hétérotopique cardiaque. Bien que les expériences de transplantation cardiaque s'effectuent habituellement chez les rongeurs, il existe une technique modifiée qui permet l'utilisation de ce modèle chez des primates non-humains et des chiens (Minanov et al., 1997).

Transplantation hétérotopique pancréatique chez le rat

La transplantation pancréatique représente une procédure thérapeutique efficace pour traiter les patients diabétiques. Le premier modèle de transplantation pancréaticoduodénale chez des rats diabétiques fut décrit par Lee et al. (1972). Cette méthode est toujours utilisée de nos jours, mais certains groupes omettent la transplantation du duodénum (Chen et al., 1995b).

Techniques chirurgicales. Dans la transplantation pancréatique chez le rongeur, le donneur et le receveur rendu diabétique (après un traitement à la streptozotocine, 55 mg/kg iv) reçoivent une solution de 5% de glucose et 0.9% de salin, 24 heures avant la chirurgie. L'allogreffe pancréaticoduodénale est recueillie du donneur, avec un segment de l'aorte comprenant les artères mésentériques supérieure et ciliaque qui nourrissent le greffon, et un segment de la veine porte représentant le drainage veineux du greffon. Le greffon est transplanté chez le receveur en effectuant des anastomoses vasculaires de type *end-to-side* entre le segment aortique du donneur et l'aorte du receveur, et entre le segment de la veine porte du donneur et la veine cave inférieure du receveur, à l'aide de sutures continues en nylon de calibre 10-0. L'extrémité proximale du duodénum de l'allogreffe est ligaturée et l'extrémité distale est anastomosée sur le côté de la troisième portion du duodénum du receveur, en utilisant un moule dégradable inséré à chaque bout pour créer une attelle intestinale (Figure 1.9.3). Une solution de lactate de Ringer à 4°C est utilisée pour refroidir le greffon. Le temps d'ischémie froide de l'allogreffe est inférieur à 45 minutes. Le taux de glucose sanguin de l'hôte est mesuré de façon bihebdomadaire. Le temps de rejet (survie de l'allogreffe) est défini comme étant le jour

où le niveau de glucose sanguin est supérieur à 14 mmol/L, pendant deux jours consécutifs.

Physiologie de l'allogreffe pancréatique. En transplantation clinique, il faut considérer les aspects physiologiques du pancréas transplanté, surtout lorsque le drainage de l'allogreffe pancréatique doit emprunter d'autres systèmes physiologiques. La transplantation du pancréas permet de rétablir la glycémie normale chez le receveur, après seulement quelques minutes à heures suite à l'intervention. De plus, tant que l'allogreffe pancréatique reste fonctionnelle, le control métabolique à long terme demeure normal et stable, tel que mesuré par les taux d'hémoglobine glycosylée. Un avantage additionnel de la transplantation pancréatique est la capacité régulatrice du glucagon en réponse à une hypoglycémie. Cependant, les aspects problématiques d'une telle intervention demeurent l'altération des fonctions exocrines du pancréas transplanté, particulièrement lorsque le pancréas, normalement transplanté de pair avec un rein, est drainé par la voie urinaire. L'activation des enzymes pancréatiques dans la vessie peut causer une dysurie, une hématurie, des pertes d'urine, voire un dommage important au niveau de l'urètre avec un rétrécissement ou une rupture de ce dernier. De plus, la perte de bicarbonate au niveau de la vessie d'un receveur transplanté pancréatique, dont le pancréas est drainé par le système urinaire, peut causer une acidose métabolique ou une déshydratation. Si le pancréas est drainé via le système digestif (par exemple, le côlon), les dommages liés à la fonction exocrine du pancréas sont minimisés (Pirsch et al., 2001).

Modèle d'étude. La transplantation hétérotopique pancréatique chez le rat est un modèle expérimental efficace pour évaluer l'efficacité des nouveaux agents ou traitements contre le rejet aigu et les lésions de l'ischémie/reperfusion (Mark et al., 2002; Wakai et al., 2002). De plus, le modèle de transplantation pancréatique chez le rat est utilisé dans de récentes études pour étudier le rejet de xénogreffe et le fonctionnement physiologique du pancréas transplanté (Yin et al., 2002; Gu et al., 2002).

En clinique, il existe une alternative thérapeutique à la transplantation du pancréas total. La transplantation des îlots pancréatiques est une méthode intéressante, qui comporte certains avantages mais aussi des inconvénients (par exemple, la technique est très laborieuse).

Transplantation orthotopique rénale chez le rat

La transplantation rénale chez le rat est un des modèles expérimentaux les plus utilisés pour étudier le phénomène du rejet aigu et l'efficacité des nouveaux agents immunosuppresseurs. La technique de transplantation rénale a été originalement décrite par Fisher et Lee, et elle consiste en la transplantation hétérotopique rénale en effectuant des anastomoses de type *end-to-side* entre l'artère rénale du greffon et l'aorte du donneur, et entre la veine rénale de l'allogreffe et la veine cave inférieure du receveur. Cependant, cette technique requiert plus de 30 minutes d'occlusion de la veine cave inférieure et de l'aorte du receveur durant la transplantation, ce qui cause un stress considérable chez le receveur. Avec la technique améliorée de la transplantation orthotopique rénale, la physiologie du receveur n'est point altérée durant l'intervention chirurgicale.

Techniques chirurgicales. La transplantation orthotopique rénale est effectuée selon la méthode de Fisher et Lee, mais avec des modifications (Chen et al., 1995c). Le rein gauche est perfusé à travers l'aorte avec une solution saline avec héparine à 4°C, et il est récolté à bloc, après avoir sectionné l'uretère, l'artère rénale près de l'aorte et la veine rénale près de la veine cave. L'allogreffe rénale est préservée dans une solution de lactate de Ringer à 4°C, pendant moins de 30 minutes. Le receveur est anesthésié et une néphrectomie gauche est effectuée après une section de l'uretère, l'artère rénale et la veine rénale. Des anastomoses de type *end-to-end* sont effectuées entre les artères et les veines rénales du donneur au receveur, à l'aide de sutures en nylon de calibre 10-0. Après libération des clamps vasculaires, une anastomose de type *end-to-end* est

effectuée entre l'uretère du donneur et l'uretère du receveur. Avant de refermer l'abdomen, le rein droit natif du receveur est retiré (Figure 1.9.4).

Physiologie de l'allogreffe rénale. En clinique, la transplantation rénale demeure une procédure thérapeutique pour traiter les patients en défaillance rénale, voire en traitement d'hémodialyse. Néanmoins, le patient transplanté rénal ne reçoit habituellement pas l'équivalence de néphrons dont il aurait idéalement besoin. Ceci est un peu dû au fait que la stratégie implique le remplacement des reins défaillants par un seul rein fonctionnel, mais plutôt à cause du stress causé sur l'allogreffe lors de la préservation, la transplantation et la prise des agents immunosuppresseurs (par exemple, la néphrotoxicité induite par la cyclosporine ou le tacrolimus). La fonction physiologique du rein transplanté est grandement corrélée à sa capacité de filtration glomérulaire, et le taux de filtration glomérulaire est influencé par plusieurs facteurs tel le statut du donneur, les conditions de sélection du receveur et de préservation de l'organe, et les aspects peropératoires et postopératoires chez le receveur. Le rein transplanté possède des caractéristiques physiologiques importantes à considérer en clinique puisqu'ils ont un impact direct sur la survie de l'allogreffe, voire sur celle du patient.

- 1) Diminution de la masse des néphrons: L'effet d'une incompatibilité de la masse (diminution) des néphrons entre le donneur et le receveur cause l'augmentation de la tension systémique et celle des capillaires des glomérules, un stress considérable sur l'allogreffe rénale, voire une capacité réduite de filtration glomérulaire à long terme.
- 2) Fonctions métaboliques: La fonction métabolique du rein transplanté est en étroite relation avec son taux de filtration glomérulaire. Plus le taux de filtration glomérulaire est grand, plus le rein est efficace à détoxiquer les médicaments et à produire les hormones nécessaires à la régulation de l'érythropoïèse et l'homéostasie du calcium et du phosphore. En outre, puisque le rein transplanté est dénervé, son système de régulation rénine-angiotensine-aldostérone est inapte à fonctionner adéquatement (par exemple, en réponse à une diète faible en sel).
- 3) Gestion des électrolytes: Les défaillances dans le transport des électrolytes au niveau du tubule proximal ne sont pas

rares chez les patients transplantés, et cela peut causer la glycosurie, le syndrome de Fanconi (la phosphaturie, bicarbonaturie, l'amidoacidurie, et l'uricosurie), des acidoses ou l'hyperkaliémie. 4) Hématurie et protéinurie: L'hématurie peut survenir de manière précoce en période de posttransplantation, et elle est habituellement due aux infections urinaires ou aux malformations du tractus urogénital. La protéinurie indique une fuite des protéines au niveau du glomérule qui nuisent au bon fonctionnement des mécanismes tubulaires. La présence concomitante d'une hématurie et d'une protéinurie est un signe de rejet aigu d'allogreffe rénale ou de glomérulonéphrite récurrente (Weir, 2001).

Modèle d'étude. La transplantation orthotopique rénale chez le rat est un modèle expérimental efficace et très utilisé pour évaluer l'efficacité des nouveaux agents ou traitements contre les rejets aigu, chronique et de xénogreffe, et contre les dommages de l'ischémie/reperfusion. De plus, la transplantation orthotopique rénale est le modèle par excellence pour l'évaluation de nouvelles molécules ou thérapies combinées immunosuppressives lors d'études précliniques chez le primate non-humain (Qi et al., 2000).

